

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Альгимед»

Л.Е. Батуρο

«16» октября 2020 г.



ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. КОРМА.

Методика измерений содержания бацитрацина методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ИФА-антибиотик бацитрацин»

МИ В003-2020

(взамен МИ В003-2019)

**Москва
2020**

ПРЕДИСЛОВИЕ

1 РАЗРАБОТАНА Обществом с ограниченной ответственностью «Альгимед»» (ООО «Альгимед») «17» августа 2020 г.

2 АТТЕСТОВАНА Федеральным бюджетным учреждением «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в г. Москве» (ФБУ «Ростест-Москва») «16» октября 2020 г.

3 УТВЕРЖДЕНА «16» октября 2020 г. приказом Генерального директора ООО «Альгимед»

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ от «16» октября 2020 г.
№ 7640/03-RA.RU.311703-2020 выдано ФБУ «Ростест-Москва»

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ № ФР.1.31.2020.38381

Содержание

1 ВВОДНАЯ ЧАСТЬ.....	6
1.1 Назначение и область применения методики измерений.....	6
1.2 Область применения методики измерений включает в себя следующие виды продукции	6
1.3 Методика вводится взамен МИ В003-2019.....	6
2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	6
3 ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ.....	8
4 ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ УСТРОЙСТВАМ, МАТЕРИАЛАМ, РЕАКТИВАМ	11
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	14
7.1 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении.....	15
7.2 Условия хранения набора реагентов.....	15
8 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ	15
8.1 Отбор образцов.....	15
8.2 Подготовка лабораторной посуды.....	16
8.3 Приготовление растворов	16
8.3.1 Приготовление буферного раствора для разбавления проб.....	16
8.3.2 Приготовление 75 % (по объему) раствора метанола	17
8.3.3 Приготовление 0,1 М раствора гидроокиси натрия.....	17
8.4 Подготовка проб	17
8.4.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного, пастеризованного, ультрапастеризованного и сухого восстановленного молока.	17
8.4.2 Подготовка проб мяса (говядина, баранина, свинина, конина), мяса птицы, готовых к употреблению мясных и мясосодержащих продуктов и продуктов переработки птицы, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, пищевой мясной и/или рыбной продукции для детского питания.....	18

8.4.3 Подготовка проб субпродуктов (в том числе птичьих), продуктов, содержащих субпродукты (в том числе птичьих), продуктов переработки субпродуктов (в том числе птичьих), жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик) ..	19
8.4.4 Подготовка проб яиц, яйцепродуктов, продуктов переработки яиц	20
8.4.5 Подготовка проб продукции аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы	20
8.4.6 Подготовка проб кормов (комбикорм, мясокостная мука)	21
8.4.7 Подготовка проб меда	21
8.5 Подготовка набора реагентов	22
8.5.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов	22
8.5.2 Подготовка микротитровального планшета	22
8.5.3 Подготовка промывочного раствора	23
9 ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ	23
9.1 Общие требования	23
9.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно ..	23
9.3 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа	24
9.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб	24
9.3.2 Добавление раствора конъюгата	24
9.3.3 Инкубация планшета	24
9.3.4 Промывка планшета	24
9.3.5 Добавление ТМБ-субстрата	24
9.3.6 Повторная инкубация	25
9.3.7 Добавление стоп-реагента	25
9.3.8 Измерение оптической плотности	25
10 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ	25
10.1 Расчет массовой концентрации бациллацина	25
10.2 Критерии правильности выполнения измерений	27
10.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	27
11 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	27

11.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности.....	27
11.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации бацитрацина с использованием предела измерения	28
11.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации бацитрацина с использованием значения верхней границы диапазона измерений	28
12 КОНТРОЛЬ ТОЧНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	28
12.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости.....	28
12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности.....	29
12.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости	29
12.4 Контроль правильности.....	31
12.4.1 Образцы контроля, представляющие собой рабочие пробы с добавкой....	31
12.4.2 Проведение контрольной процедуры.....	32
12.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)	32
12.5.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости.....	33
12.5.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности	33
БИБЛИОГРАФИЯ	35

1 ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Назначение и область применения методики измерений

Настоящая методика измерений устанавливает методику измерений (далее – МИ) массовой доли антибиотика бацитрацина в указанной ниже продукции животного происхождения и кормах методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «ИФА антибиотик-бацитрацин», каталожный номер В003-96, производства ООО «Альгимед Техно» (Республика Беларусь), (далее – набор реагентов).

1.2 Область применения методики измерений включает в себя следующие виды продукции:

- молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное) и сухое восстановленное молоко;
- мясо (говядина, свинина, баранина, конина), мясо птицы, готовые к употреблению мясные и мясосодержащие продукты и продукты из птицы, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, пищевая мясная и/или рыбная продукция для детского питания;
- субпродукты (в том числе птичьи), продукты, содержащие субпродукты (в том числе птичьи), продукты переработки субпродуктов (в том числе птичьих), жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик);
- яйца, яйцепродукты сухие и жидкие, продукты переработки яиц;
- продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы;
- корма (комбикорм, мясокостная мука);
- мед.

1.3 Методика вводится взамен МИ В003-2019.

2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей методике использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 12.0.004–90 «Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие требования»

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

ГОСТ 12.1.005–88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.007–76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности»

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

ГОСТ 13496.0–2016 «Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб»

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

ГОСТ 19792–2017 «Мед натуральный. Технические условия»

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

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

ГОСТ 26809.1–2014 «Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты»

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 30364.0–97 «Продукты яичные. Методы отбора проб и органолептического анализа»

ГОСТ 31339–2006 «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб»

ГОСТ 31654–2012 «Яйца куриные пищевые. Технические условия»

ГОСТ 32244–2013 «Субпродукты мясные обработанные. Технические условия»

ГОСТ 4328–77 «Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия»

ГОСТ 6709–72 «Вода дистиллированная. Технические условия»

ГОСТ 6995–77 «Реактивы. Метанол-яд. Технические условия»

ГОСТ 8.010–2013 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения»

ГОСТ ISO 6497–2014 «Корма. Отбор проб»

ГОСТ Р 51447–99 «Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб»

ГОСТ Р ИСО 5555–2010 «Животные и растительные жиры и масла. Отбор проб»

ГОСТ Р ИСО 5725–2–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений»

ГОСТ Р ИСО 5725–4–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений»

ГОСТ Р 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 рекомендации 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

3.1 Диапазон измерений методики составляет:

Область применения МИ включает в себя следующие виды продукции:

- молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное) и сухое восстановленное молоко от 9,0 до 600,0 мкг/кг;
- мясо (говядина, свинина, баранина, конина), мясо птицы, готовые к употреблению мясные и мясосодержащие продукты и продукты из птицы, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, пищевая мясная и/или рыбная продукция для детского питания от 9,0 до 600,0 мкг/кг;
- субпродукты (в том числе птичьи), продукты содержащие субпродукты (в том числе птичьи), продукты переработки субпродуктов (в том числе птичьих), жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик) от 9,0 до 600,0 мкг/кг;
- яйца, яйцепродукты сухие и жидкие, продукты переработки яиц от 9,0 до 600,0 мкг/кг;
- продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы от 9,0 до 600,0 мкг/кг;
- корма (комбикорм, мясокостная мука) от 36,0 до 2400,0 мкг/кг;
- мед от 11,0 до 600,0 мкг/кг.

3.2 Предел измерения для данной методики составляет:

- молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное) и сухое восстановленное молоко 9,0 мкг/кг;
- мясо (говядина, свинина, баранина, конина), мясо птицы, готовые к употреблению мясные и мясосодержащие продукты и продукты из птицы, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, пищевая мясная и/или рыбная продукция для детского питания 9,0 мкг/кг;
- субпродукты (в том числе птичьи), продукты содержащие субпродукты (в том числе птичьи), продукты переработки субпродуктов (в том числе птичьих), жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик) 9,0 мкг/кг;
- яйца, яйцепродукты сухие и жидкие, продукты переработки яиц 9,0 мкг/кг;
- продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы 9,0 мкг/кг;

- корма (комбикорм, мясокостная мука) 36,0 мкг/кг;
- мед 11,0 мкг/кг.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой концентрации бацитрацина в указанном выше диапазоне с показателями точности, указанными в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей промежуточной прецизионности и повторяемости

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости $\sigma_r, \%$	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(10)}, \%$
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное) и сухое восстановленное молоко	от 9,0 до 600,0	9,2	12,0
Мясо (говядина, свинина, баранина, конина), мясо птицы, готовые к употреблению мясные и мясосодержащие продукты и продукты из птицы, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, пищевая мясная и/или рыбная продукция для детского питания	от 9,0 до 600,0	7,1	7,8
Субпродукты (в том числе птичьи), продукты содержащие субпродукты (в том числе птичьи), продукты переработки субпродуктов (в том числе птичьих)	от 9,0 до 600,0	7,7	11,6
Жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик)	от 9,0 до 600,0	10,3	12,9
Яйца, яйцепродукты сухие и жидкие, продукты переработки яиц	от 9,0 до 600,0	5,3	8,9

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(ТО)}$, %
Продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы	от 9,0 до 600,0	8,2	13,6
Корма (комбикорм, мясокостная мука)	от 36,0 до 2400,0	7,7	10,3
Мед	от 11,0 до 600,0	7,1	7,8

Значения оценок относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с методикой измерений

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность U_c , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K=2, P=95\%$
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное) и сухое восстановленное молоко	от 9,0 до 600,0	14,31	28,62
Мясо (говядина, свинина, баранина, конина), мясо птицы, готовые к употреблению мясные и мясосодержащие продукты и продукты из птицы, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, пищевая мясная и/или рыбная продукция для детского питания	от 9,0 до 600,0	6,15	12,30
Субпродукты (в том числе птичьи), продукты содержащие	от 9,0 до 600,0	10,35	20,70

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность U_c , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K=2$, $P=95$ %
субпродукты (в том числе птичьи), продукты переработки субпродуктов (в том числе птичьих)			
Жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик)	от 9,0 до 600,0	10,74	21,48
Яйца, яйцепродукты сухие и жидкие, продукты переработки яиц	от 9,0 до 600,0	14,54	29,08
Продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы	от 9,0 до 600,0	12,39	24,78
Корма (комбикорм, мясо-костная мука)	от 36,0 до 2400,0	12,74	25,48
Мед	от 11,0 до 600,0	7,10	14,20

Эксперименты по оцениванию метрологических характеристик МИ были проведены в 2020 году. Указанные в таблицах 1 – 2 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента в соответствии с: показатели прецизионности – ГОСТ Р 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 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 500 г, ценой деления не более 0,01 г;
- автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более ± 5 %);
- термометр лабораторный частичного погружения класса точности 1 с ценой деления 1°C по ГОСТ 28498;
- дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников:

с диапазоном объемов дозирования от 20 до 200 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,5 \%$;

с диапазоном объемов дозирования от 100 (200) до 1000 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5 \%$;

с диапазоном объемов дозирования от 5 до 50 см³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0 \%$;

многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 50 до 300 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более $\pm 2,0 \%$.

- колбы мерные 2-100-2 или 3-100-2 по ГОСТ 1770;

- колбы Кн-1-100-14/23, Кн-1-250-24/29, Кн-1-500-29/32, Кн-1-1000-45/40 по ГОСТ 25336;

- стаканы Н-1-100 или Н-1-150 по ГОСТ 25336;

- пипетки, градуированные на 5, 10, 20 и 25 см³ по ГОСТ 29227;

- цилиндры мерные 2-25-1.2-50-1, 2-250-1 по ГОСТ 1770;

Испытательное и вспомогательное оборудование и приспособления, расходные материалы:

- центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (пробирки вместимостью 15 см³);

- лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин;

- лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин,

- гомогенизатор лабораторный типа *ULTRA-TURRAX* производства *IKA® Werke GmbH & Co. K.G* (Германия) или аналогичный, не уступающий по качеству, или бытовой блендер;

- холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 18 °С в морозильной камере;

- баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры от плюс 35 до плюс 80°С с точностью $\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$;

- шаблон для обработки результатов измерений средствами *Microsoft® Office Excel* (версии не ниже 8.0) «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-бацитрацин», разработанный ООО «Альгимед Техно»;

- пробирки стеклянные вместимостью от 5 до 15 см³;

- пробирки для центрифугирования из полипропилена вместимостью 15 см³ и на 1,5 - 5 см³;

- стакан стеклянный вместимостью 500 см³;

- бумага фильтровальная ФБ-Ш по ГОСТ 12026;

- микрофибровые салфетки;

- шпатели пластиковые;

- штатив для пробирок.

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

- инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 до плюс 25 °С с погрешностью ± 1 °С;

- устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую лунку микропланшета, от 100 мм³ до 350 мм³, например, *3D-IW8*, производства *BioSan Ltd*, Латвия;

- пленка «парафильм».

Реактивы:

- вода дистиллированная-или вода деионизированная;

- метанол ч.д.а. по ГОСТ 6995.

- гидроокись натрия ч.д.а. по ГОСТ 4328.

- набор реагентов «ИФА-антибиотик бацитрацин» производства ООО «Альгимед Техно» (Республика Беларусь), состоящие из реактивов и микротитровального планшета, необходимых для выполнения измерений по определению содержания бацитрацина методом иммуноферментного анализа. Состав наборов реагентов приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав наборов реагентов

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к бацитрацину)	1 шт.
Градуировочные растворы бацитрацина с концентрацией:	6 шт.
0 нг/см ³	1,5 см ³
0,6 нг/см ³	1,5 см ³
1,5 нг/см ³	1,5 см ³
4,5 нг/см ³	1,5 см ³
13,5 нг/см ³	1,5 см ³
40,0 нг/см ³	1,5 см ³
Конъюгат	8,0 см ³
5-тикратный концентрат буферного раствора для разбавления проб	25 см ³
20-тикратный концентрат промывочного раствора	20 см ³
Стоп-реагент	12 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³

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

- 5-кратный концентрат буферного раствора для разбавления проб;
- 20-ти кратный концентрат промывочного раствора;

- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат.

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

5 МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Используемый метод основан на конкурентном иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого антителами к бацитрацину, вместе с пробой (калибровочной или исследуемой) добавляют конъюгат (бацитрацин, конъюгированный с пероксидазой хрена). Конъюгат связывается с иммобилизованными антителами. Если в пробе присутствует бацитрацин, он конкурирует с конъюгатом за связывание с антителами. После добавления субстрата, а затем стоп-реагента, измеряется оптическая плотность раствора при 450 нм. Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации бацитрацина в градуировочном растворе и антибиотика в растворе пробы. Массовая концентрация бацитрацина (антибиотика) в пробе 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 12.1.019;
- 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;
- 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;
- при низкой относительной влажности воздуха и наличии воздушных потоков с целью устранения возможности испарения содержимого лунок рекомендуется покрывать планшет пленкой «парафильм» или специальной пленкой/мембранной для иммуноферментных микротитровальных планшетов;
- в особых случаях, которые оговорены по тексту методики измерений, требуется помещать планшет в защищенное от света место.

7.2 Условия хранения набора реагентов

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

Микротитровальный планшет должны храниться в плотно закрытой упаковке. Неиспользованные стрипы микротитровального планшета следует поместить в упаковочном пакете плотно закрытыми с осушителем внутри при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Необходимо исключить прямое попадание солнечного света на раствор ТМБ-субстрата.

8 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

8.1 Отбор образцов

Отбор образцов молока производится по ГОСТ 26809.1, мяса по ГОСТ Р 51447, субпродуктов по ГОСТ 32244, жира по ГОСТ Р ИСО 5555, яиц по ГОСТ 31654, яичных продуктов по ГОСТ 30364.0, кормов по ГОСТ ISO 6497 или ГОСТ 13496.0, рыбы и нерыбных объектов аквакультуры и продукции из них по ГОСТ 31339, меда по ГОСТ 19792 или иному НД, установленному на предприятии.

Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 20 °С в течение 1 месяца. Перед проведением подготовки проб по п. 8.4 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

8.2 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе лабораторного детергента промывают водопроводной, ополаскивают дистиллированной водой 10 раз и высушивают. При обработке дозаторов пипеточных, стеклянной посуды и рабочих поверхностей необходимо использовать только 70 % раствор этилового спирта.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ:

- повторное использование одноразовой лабораторной посуды;
- использование бытовых моющих средств для мойки лабораторной посуды.
- использование перекиси водорода и хлорамина.

8.3 Приготовление растворов

8.3.1 Приготовление буферного раствора для разбавления проб

В коническую колбу вместимостью 100 или 250 см³ (в зависимости от необходимого объема готового раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 5-тикратного концентрата буферного раствора для разбавления проб, добавляют цилиндром в 4 раза больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V_{sp} см³, 5-тикратного концентрата буферного раствора для разбавления проб, рассчитывается по формуле (1)

$$V_{sp} = \frac{1,4 \cdot N_{smp1} + 1,8 \cdot N_{smp2} + 2,9 \cdot N_{smp3} + V_1}{5} \quad (1)$$

где N_{smp1} – количество анализируемых образцов: молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное) и сухое восстановленное молоко

N_{smp2} – количество анализируемых образцов мяса, мяса птицы, готовых к употреблению мясных и мясосодержащих продуктов и продуктов переработки птицы, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, пищевой мясной и/или рыбной продукции для детского питания, субпродуктов (в том числе птичьих), продуктов, содержащих субпродукты (в том числе птичьих), продуктов переработки субпродуктов (в том числе птичьих), жиров животного происхождения (в том числе сало и шпик), яиц, яйцепродуктов сухих и жидких, продуктов переработки яиц, продукции аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарных изделия из рыбы, варено-мороженой пищевой рыбной продукции, рыбные консервов и пресерв, меда;

N_{smp3} – количество анализируемых образцов корма (комбикорм, мясокостная мука);

V_1 – объем буферного раствора для разбавления проб, готовящегося в запас, см³ (не менее 3 см³)

Буферный раствор готовится непосредственно перед использованием и не подлежит хранению.

8.3.2 Приготовление 75 % (по объему) раствора метанола

В коническую колбу вместимостью 100 или 250 см³ (в зависимости от необходимого объема готового раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.1, и добавляют цилиндром в 3 раз больший объем метанола.

Объем используемой аликвоты $V_{спМ}$ см³ приготовленного по п.8.3.1 буферного раствора для разбавления проб для анализируемых образцов рассчитывается по формуле (2)

$$V_{спМ} = \frac{2 \cdot N_{смп2} + 3 \cdot N_{смп3} + V_1}{4} \quad (2)$$

где $N_{смп2}$ – количество анализируемых образцов мяса, мяса птицы, готовых к употреблению мясных и мясосодержащих продуктов и продуктов переработки птицы, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, пищевой мясной и/или рыбной продукции для детского питания, субпродуктов (в том числе птичьих), продуктов, содержащих субпродукты (в том числе птичьих), продуктов переработки субпродуктов (в том числе птичьих), жиров животного происхождения (в том числе сало и шпик), яиц, яйцепродуктов сухих и жидких, продуктов переработки яиц, продукции аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарных изделия из рыбы, варено-мороженой пищевой рыбной продукции, рыбные консервы и пресервы, меда;

$N_{смп3}$ – количество анализируемых образцов корма (комбикорм, мясокостная мука);

V_1 – объем буферного раствора для разбавления проб приготавливаемого в запас, см³ (не менее 3 см³)

Раствор 75 %-ного метанола готовится непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

8.3.3 Приготовление 0,1 М раствора гидроокиси натрия

В стакан вместимостью 500 см³ вносят навеску гидроокиси натрия массой $(1,00 \pm 0,01)$ г и приливают 250 см³ дистиллированной воды, отмеренной мерным цилиндром. Раствор перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения гидроокиси натрия. Раствор переливают в пластиковую емкость и хранят в течение 1 месяца при комнатной температуре.

8.4 Подготовка проб

8.4.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного, пастеризованного, ультрапастеризованного и сухого восстановленного молока.

Перед началом пробоподготовки температуру образца доводят до плюс 20 до 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего образец перемешивают путем встряхивания и переворачивания упаковки. Измеряют pH молока, доводя значение pH образца до 6-7 с помощью 0,1 М раствора гидроокиси натрия, приготовленного по п. 8.3.3.

Для восстановления сухого молока в мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают две навески для параллельных определений образца, взвешенные с погрешностью не более $\pm 0,1$ г. Масса навесок в зависимости от содержания жира составляет:

9 г сухого обезжиренного молока;

12 г сухого молока с содержанием жира 20 %;

12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;

10 г сухого молока с содержанием жира отличным от приведенного выше.

Затем приливают небольшими порциями по 10-20 см³ дистиллированную воду (примерно 80 см³), нагретую (на водяной бане) до температуры 40 °С, перемешивая содержимое колбы до полного растворения образца.

Раствор охлаждают до температуры от плюс 18 до плюс 22 °С и доводят до метки дистиллированной водой.

8.4.1.1 Получение обезжиренных образцов

Перед взятием аликвоты испытуемый образец тщательно перемешивают на вортексе. От образца молока с помощью пипетки или дозатора отбирают две пробы параллельных определений объемом по 10 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробы в следующем режиме: 4 °С, 4000 g, 5 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением образцы молока перед центрифугированием выдерживают в морозильном отделении холодильника 10 мин. Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования.

8.4.1.2 Получение растворов проб

Аликвоты обезжиренного молока объемом 50 мм³, отобранные дозатором из каждой пробы, переносят в пробирку, для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью от 1,5 до 2,0 см³ (перед тем, как вылить молоко в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой, для удаления возможных следов жира). Затем в пробирки добавляют 700 мм³ буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.1. Тщательно перемешивают.

Для проведения анализа используют по 100 мм³ пробы на лунку планшета.

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

Примечание – Фактор разбавления: 15.

8.4.2 Подготовка проб мяса (говядина, баранина, свинина, конина), мяса птицы, готовых к употреблению мясных и мясосодержащих продуктов и продуктов переработки птицы, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, пищевой мясной и/или рыбной продукции для детского питания

Перед началом пробоподготовки температуру образца доводят до температуры от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, удаляют оболочку и несъедобные части, после чего гомогенизируют образцы с помощью гомогенизатора или блендера.

От каждого образца отбирают две навески для параллельных определений 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 2,0 см³ 75%-ного метанола, приготовленного по п. 8.3.2, и перемешивают 15 мин на вортексе на максимальной скорости или ротационном смесителе в течение 20 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. Дозатором отбирают аликвоты объемом 100 мм³ супернатанта и переносят их в пробирки объемом 1,5-2 см³. В пробирки с аликвотами супернатанта вносят по 400 мм³ буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.1, и перемешивают 1 минуту на вортексе.

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

Для проведения анализа используют по 100 мм³ пробы на каждую лунку планшета.

П р и м е ч а н и е – Фактор разбавления: 15.

8.4.3 Подготовка проб субпродуктов (в том числе птичьи), продуктов, содержащих субпродукты (в том числе птичьи), продуктов переработки субпродуктов (в том числе птичьих), жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик)

Перед началом пробоподготовки температуру образца доводят до температуры от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Удаляют из образца несъедобные части, в том числе грубые и кальцинированные сухожилия, костную ткань, оболочку, после чего гомогенизируют их с помощью гомогенизатора или блендера.

От каждого образца отбирают две навески для параллельных определений 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 2,0 см³ 75 %-ного метанола, приготовленного по п. 8.3.2, и перемешивают 15 мин на вортексе на максимальной скорости или ротационном смесителе в течение 20 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. Дозатором отбирают аликвоты объемом 100 мм³ супернатанта и переносят их в пробирки объемом от 1,5 до 2 см³. В пробирки с аликвотами супернатанта вносят по 400 мм³ буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.1, и перемешивают 1 мин на вортексе.

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

Для проведения анализа используют по 100 мм³ пробы на каждую лунку планшета.

Примечание – Фактор разбавления: 15.

8.4.4 Подготовка проб яиц, яйцепродуктов, продуктов переработки яиц

Перед началом пробоподготовки температуру образца доводят до температуры от плюс 20 до плюс 25 °С выдерживая его при комнатной температуре.

Яйца освобождают от скорлупы и гомогенизируют с помощью блендера и гомогенизатора. Жидкие яичные продукты гомогенизируют с помощью блендера и гомогенизатора. Сухие яичные продукты необходимо тщательно перемешать. Восстановление продукта необходимо провести следующим образом: образец массой 2,00 г, взвешенный с точностью до 0,01 г, поместить в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки с пробами добавляют отмеренные дозатором или мерным цилиндром 8 см³ дистиллированной или деионизированной воды.

При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения. Пробы массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, гомогенизированного образца яиц, жидких яйцепродуктов или восстановленных сухих яйцепродуктов. Навеску пробы помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки с пробами добавляют отмеренные дозатором 2,0 см³ 75 %-ного метанола, приготовленного по п. 8.3.2, и перемешивают 15 мин на вортексе на максимальной скорости или ротационном смесителе в течение 20 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. Дозатором отбирают аликвоты объемом 100 мм³ супернатанта и переносят их в пробирки объемом от 1,5 до 2 см³. В пробирки с аликвотами супернатанта вносят по 400 мм³ буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.1, и перемешивают 1 мин на вортексе.

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

Для проведения анализа используют по 100 мм³ пробы на каждую лунку планшета.

Примечание – Фактор разбавления: 15.

8.4.5 Подготовка проб продукции аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженная пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы

Перед началом пробоподготовки температуру образца доводят до температуры от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Удаляют из образца несъедобные части, в том числе костную ткань, плавники, чешую, внутренние органы, после чего гомогенизируют их с помощью гомогенизатора или блендера.

От каждого образца отбирают две навески для параллельных определений 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 2,0 см³ 75 %-ного метанола, приготовленного по п. 8.3.2, и перемешивают 15 мин на вортексе на максимальной скорости или ротационном смесителе в течение 20 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. Дозатором отбирают аликвоты объемом 100 мм³ супернатанта и переносят их в пробирки объемом от 1,5 до 2 см³. В пробирки с аликвотами супернатанта вносят по 400 мм³ буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.1, и перемешивают 1 минуту на вортексе.

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

Для проведения анализа используют по 100 мм³ пробы на каждую лунку планшета.

Пр и м е ч а н и е – Фактор разбавления: 15.

8.4.6 Подготовка проб кормов (комбикорм, мясокостная мука)

Перед началом пробоподготовки температуру образца доводят до температуры от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От каждого образца отбирают две навески для параллельных определений 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 3,0 см³ 75 %-ного метанола, приготовленного по п. 8.3.2, и перемешивают 15 мин на вортексе на максимальной скорости или ротационном смесителе в течение 20 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. Дозатором отбирают аликвоты объемом 50 мм³ супернатанта и переносят их в пробирки объемом от 1,5 до 2 см³. В пробирки с аликвотами супернатанта вносят по 700 мм³ буферного раствора для разбавления проб и перемешивают 1 минуту на вортексе.

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

Для проведения анализа используют по 100 мм³ пробы на каждую лунку планшета.

Пр и м е ч а н и е – Фактор разбавления: 60.

8.4.7 Подготовка проб меда

Перед началом пробоподготовки температуру образца доводят до температуры от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре после чего образец перемешивают.

От каждого образца отбирают две навески для параллельных определений 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 2,0 см³ 75%-ного метанола, приготовленного по п. 8.3.2. Пробирки выдерживают до полного растворения пробы при температуре 75 °С в течение 2 мин с помощью водяной бани или термостата. После охлаждают до комнатной температуры и перемешивают 15 мин на вортексе на максимальной скорости или ротационном смесителе в течение 20 мин

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. Дозатором отбирают аликвоты объемом 100 мм³ супернатанта и переносят их в пробирки объемом от 1,5 до 2 см³. В пробирки с аликвотами супернатанта вносят по 400 мм³ буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.1, и перемешивают 1 мин на вортексе.

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

Для проведения анализа используют по 100 мм³ пробы на каждую лунку планшета.

П р и м е ч а н и е – Фактор разбавления: 15.

8.5 Подготовка набора реагентов

8.5.1 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 °С до плюс 25 °С.

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 в соответствии с п. 9.

8.5.2 Подготовка микротитровального планшета

Количество лунок микротитровального планшета, необходимых для проведения измерений N_w , рассчитывается по формуле (3)

$$N_w = 12 + 2N_{SMP}, \quad (3)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные соответствии с п. 8.5.1, 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 «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-бацитрацин», разработанный ООО «Альгимед Техно», 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 или согласно п. 9.2.

8.5.3 Подготовка промывочного раствора

Аликвоту 20-тикратного концентрата промывочного раствора, отмеренную мерным цилиндром, переносят в коническую колбу вместимостью 500 или 1000 см³, приливают отмеренную мерным цилиндром дистиллированную воду, объем которой в 19 раз больше объема аликвоты концентрата, и перемешивают. Объем аликвоты концентрата выбирается в зависимости от предполагаемого количества анализируемых образцов. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 1 месяца в стеклянной или полиэтиленовой посуде. Требуемый объем используемой аликвоты концентрата промывочного раствора V_w , см³, определяют по формуле (4)

$$V_w = \frac{0.25 N_w + V_1}{20} \quad (4)$$

где N_w – планируемое к использованию количество лунок микротитровального планшета;

V_1 – объем готового к использованию промывочного раствора, готовящегося в запас, см³ (не менее 10 см³).

9 ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

9.1 Общие требования

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

9.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно

При использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - бацитрацин» допускается в ходе проведения измерений выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно.

Для этого внесение раствора конъюгата по п. 9.3.2, ТМБ-субстрата по п. 9.3.5, стоп-реагента по п. 9.3.7, 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 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа

9.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки планшета, вносят дозатором по 100 мм³ каждого градуировочного раствора в две параллельные лунки. Внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0 нг/ см³, 0,6нг/ см³, 1,5 нг/см³, 4,5 нг/см³, 13,5 нг/ см³, 40 нг/ см³). В соответствующие лунки планшета вносят дозатором по 100 мм³ растворов каждой параллельной пробы анализируемых образцов.

9.3.2 Добавление раствора конъюгата

В лунки планшета внести по 50 мм³ раствора конъюгата. Перемешать содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 минуту.

9.3.3 Инкубация планшета

Сразу после перемешивания помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С и инкубируют в течение 60 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 60 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.1.

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении). Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета.

9.3.4 Промывка планшета

Промывают планшет 3 раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм³ промывочного раствора, приготовленного по п. 8.5.3, 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 - 3, объем заливаемого моющего раствора - 250 мм³.

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

9.3.5 Добавление ТМБ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТМБ-субстрата, после чего сразу же засекают время начала инкубации. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

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

9.3.6 Повторная инкубация

Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С и инкубируют в течение 20 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в помещении в защищенном от света месте при соблюдении условий, указанных в разделе 7.1. По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении).

9.3.7 Добавление стоп-реактента

Сразу же после окончания времени инкубации в каждую лунку вносят по 100 мм³ стоп-реактента и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

9.3.8 Измерение оптической плотности

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 ИЗМЕРЕНИЯ

10.1 Расчет массовой концентрации бацитрацина

Расчёт массовой концентрации антибиотика необходимо произвести с помощью «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-бацитрацин», разработанного ООО «Альгимед Техно».

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

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (5)$$

где B – оптическая плотность раствора;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией 0 мкг/см³;

C – концентрация бацитрацина в растворе, мкг/кг;

a, b – коэффициенты линейной регрессии.

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

Концентрация бацитрацина в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле (6)

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x/B_0 - a}{b}\right) \quad (6)$$

где X – концентрация бацитрацина в пробе, мкг/кг;

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, равный:

15 – молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное) и сухое восстановленное молоко;

15 – мясо (говядина, свинина, баранина, конина), мясо птицы, готовые к употреблению мясные и мясосодержащие продукты и продукты из птицы, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, пищевая мясная и/или рыбная продукция для детского питания;

15 – субпродукты (в том числе птичьи), продукты содержащие субпродукты (в том числе птичьи), продукты переработки субпродуктов (в том числе птичьих), жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик);

15 – яйца, яйцепродукты сухие и жидкие, продукты переработки яиц;

15 – продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженная пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы;

60 – корма (комбикорм, мясокостная мука);

15 – мед.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб:

$$\bar{X} = (X_1 + X_2)/2 \quad (7)$$

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

Если рассчитанное значение $\bar{X}$ оказывается меньше, чем значение предела измерений, указанное в разделе 3, то вместо окончательного результата измерения выдается односторонняя оценка массовой доли антибиотика бацитрацина в образце с использованием предела измерений согласно п. 11.2.

Если значение $\bar{X}$ не менее предела измерений, указанного в разделе 3, то за окончательный результат измерений принимают полученное значение $\bar{X}$ согласно п. 11.1 при выполнении условия повторяемости по п. 10.3.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 3, то дается односторонняя оценка массовой доли антибиотика бацитрацина в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 11.3. Окончательный результат измерений округляют до трех значащих цифр.

10.2 Критерии правильности выполнения измерений

Измерения считаются выполненными правильно, если:

- оптическая плотность в лунках с градуировочным раствором с концентрацией $0 \text{ нг/см}^3 \geq 0,6$
- коэффициент корреляции для полученного калибровочного графика $r \geq 0,95$ (при использовании «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-бацитрацин» рассчитывается автоматически).

10.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р 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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (8)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (7).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (9)$$

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

r – относительное значение предела повторяемости, %, приведено в таблице 5.

При невыполнении условия (10) 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 $P=0,95$, коэффициенте охвата $K=2$,

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 (10)

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (10)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с методикой измерений, %, приведенная в таблице 1.

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 массовой концентрации бацитрацина с использованием предела измерения

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерения X_{LQ} , указанный в разделе 3, то дается односторонняя оценка массовой концентрации бацитрацина в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг *менее* X_{LQ} , где X_{LQ} – значение предела измерений, приведенное в разделе 3.

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

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , указанное в разделе 3, то дается односторонняя оценка массовой концентрации бацитрацина в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг *более* X_{HL} , где X_{HL} – значение верхней границы диапазона измерений, приведенное в разделе 3.

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 бацитрацина при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 10.3.

12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р 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 п. 10.3. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\bar{X}_1$, $\bar{X}_2$,

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (11)$$

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abs}, \quad (12)$$

где CD_{abs} – абсолютное значение критической разности, мкг/кг, рассчитываемое по формуле

$$CD_{abs} = 0,01 \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (13)$$

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

При невыполнении условия (14) выявляют причины и принимают меры для устранения неудовлетворительного результата контроля, после чего повторно проводят измерения текущей серии образцов.

12.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725–6 следующим образом.

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

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

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (14)$$

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,

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abs}, \quad (15)$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\bar{\bar{X}}$, рассчитанное по формуле (14), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

$$CD_{abs} = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (16)$$

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

k – коэффициент, равный 1,68;

CD – относительное значение критической разности, % приведенное в таблице 4.

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

Таблица 4 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное) и сухое восстановленное молоко	25,76	28,00	34,00
Мясо (говядина, свинина, баранина, конина, птица), готовые к употреблению мясные и мясосодержащие продукты, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, пищевая мясная и/или рыбная продукция для детского питания	19,88	17,00	14,00
Субпродукты (в том числе птичьи), продукты содержащие субпродукты (в том числе птичьи), продукты переработки субпродуктов (в том числе птичьих)	21,56	29,00	33,00
Жиры животного происхождения (в том числе сало и шпик)	28,84	30,00	29,00
Яйца, яичепродукты сухие и жидкие, продукты переработки яиц	14,84	23,00	29,00

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки, икра), кулинарные изделия из рыбы, варено-мороженная пищевая рыбная продукция, рыбные консервы и пресервы	22,96	34,00	44,00
Корма (комбикорм, мясокостная мука)	21,56	24,00	25,00
Мед	19,88	17,00	14,00

12.4 Контроль правильности

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

Контроль правильности проводится с использованием добавок бацитрацина. Неопределенность значения массовой концентрации бацитрацина 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 бацитрацина в которой менее предела измерения данной методики измерений, в которую внесена добавка раствора бацитрацина. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации бацитрацина X_{am} , мкг/кг, в пробе с добавкой рассчитывается по формуле (17)

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (17)$$

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

V_{ST} – объем добавляемого раствора, см³;

m – масса навески пробы, г.

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

Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из бацитрацина в соответствии с рекомендациями производителя. Допускается использовать готовые растворы для добавки (spike-растворы) бацитрацина, при условии, что относительная стандартная неопределенность концентрации бацитрацина в них не превышает 3 %.

12.4.2 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений образцов контроля в соответствии с требованиями раздела 9. За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой концентрации бацитрацина $\overline{X}_k$ в образцах контроля, мкг/кг, рассчитанный по формуле (7) при выполнении условия повторяемости по п. 10.3.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X}_k - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \overline{X}_k, \quad (18)$$

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

X_{am} – рассчитанное значение массовой концентрации бацитрацина в образцах контроля, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (18) 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 ГОСТ Р ИСО 5725–6, раздел 6.

Для проверки стабильности соответствия результатов испытаний показателям повторяемости, установленным дайной 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 стандартного раствора. Предварительно установленная массовая концентрация бацитрацина в данных пробах без добавки должна быть менее предела обнаружения, декларируемого производителем набора реагентов. Рекомендуются вносить добавку бацитрацина 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 CL

$$CL = d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r \quad (19)$$

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

d_2 – коэффициент, равный 1,128.

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r \quad (20)$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r \quad (21)$$

где D_2^1, D_2 – коэффициенты, равные 2,834 и 3,686 соответственно.

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 МИ, расчета фактических относительных значений размаха W по формуле (22), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2} \quad (22)$$

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

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [3].

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формуле

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N W_i / N}{d_2} \quad (23)$$

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

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

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N} \quad (24)$$

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 аналита, по формуле (25)

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100 \quad (25)$$

где X_i – массовая доля аналита в пробе с добавкой, полученное для i –го измерения, мкг/кг;

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC} \quad UCL = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC} \quad (26)$$

- Границы регулирования

$$UCL = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC} \quad UCL = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC} \quad (27)$$

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

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}} \quad (28)$$

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 ОК в соответствии с МИ, расчета фактических значений коэффициента извлечения Rec_i по формуле (25), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [3].

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] ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шурхарта.