

**Методика обнаружения
остаточного количества хлорамфеникола в мясе
с использованием тест-наборов
«PIONEER MEIZHENG BIO-TECH (1 in 1) JC0307,
Chloramphenicol Rapid Test Kit (for meat)»,
производства Beijing Meizheng Bio-Tech Co, LTD, Китай**

СОДЕРЖАНИЕ

1. Область применения	3
2. Принцип метода	3
3. Характеристики методики	3
4. Оборудование и материалы	3
4.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование. .	3
4.2 Состав тест - набора.....	4
5. Условия хранения	4
6. Требования безопасности и требования квалификации операторов.....	4
6.1 Требования безопасности.....	4
6.2 Требования к квалификации персонала	5
7. Условия выполнения анализа	5
7.1 Отбор образцов.....	5
7.2 Подготовка лабораторной посуды	5
8. Подготовка образцов для анализа	5
9. Проведение анализа	6
9.1 Подготовка.....	6
9.2. Проведение анализа	6
10. Получение результата анализа и его интерпретация	7
10.1 Получение результата анализа	7
10.2 Интерпретация результатов.	7
11. Форма предоставления результатов.....	9
12. Внутренний контроль качества с использованием образцов для контроля.	9
13. Минимальные требования к лаборатории при проведении валидации ...	9
14. Нормативные ссылки.....	10

1. Область применения

Методика предназначена для экспресс определения содержания хлорамфеникола в мясе с использованием тест - наборов «PIONEER MEIZHENG BIOTECH (1 in 1) JC0307, Chloramphenicol Rapid Test Kit (for meat)», производства Beijing Meizheng Bio-Tech Co, LTD, Китай.

2. Принцип метода

В наборе реагентов используется иммунохроматографический метод с использованием частиц коллоидного золота. Проба добавляется в лунку с антителами, если в пробе присутствуют антибиотики, они будут связываться с антителами, предотвращая таким образом последующее связывание антител с антигенами, нанесенными на нитроцеллюлозную мембрану тест - полоски.

3. Характеристики методики

Предел обнаружения хлорамфеникола представлен в таблице 1.

Таблица 1

Предел обнаружения

Антибиотик	Предел обнаружения мкг/кг
Хлорамфеникол	0,1

4. Оборудование и материалы

4.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 500 г, ценой деления не более 0,1 г.

Термометр лабораторный частичного погружения, класс точности 1, цена деления 1 °С по ГОСТ 28498;

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (центрифужные пробирки вместимостью 50 см³ и 10 см³);

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 20 °С в морозильной камере;

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

Гомогенизатор лабораторного типа;

Роторный испаритель в комплекте с водяной баней, обеспечивающей поддержание температуры плюс 60 °С с точностью ± 5°С;

Инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры плюс 40 ± 3 °С, например портативный инкубатор MiniT, производства Beijing Meizheng Bio-Tech Co, LTD, Китай. Можно проводить инкубацию без использования инкубатора в закрытом помещении при температуре окружающей среды от 16 °С до 25 °С;

Считывающее устройство производства Beijing Meizheng Bio-Tech Co, LTD, Китай;

Микропипетки с переменным или фиксированным объемом дозирования, которые позволяют дозировать 150 мм³, 450 мм³, 2 см³, 4 см³, 5 см³, 7 см³ с комплектом одноразовых наконечников;

Пробирки стеклянные вместимостью 5 см³ типа П-1-5-0,1 ХС по ГОСТ 1770;

Палочки стеклянные, стаканы стеклянные вместимостью 50 см³, или колбы объемом 100 см³ по ГОСТ 25336;

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деионизированная;

Этилацетат ч.д.а по ГОСТ 22300;

Н-гексан ч.д.а. по ТУ 2631-003-05807999-98.

Допускается применение средств измерений, вспомогательного и испытательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных.

4.2 Состав тест – набора

Тест-набор «PIONEER MEIZHENG BIO-TECH (1 in 1) JC0254, Tetracyclines Rapid Test Kit (for meat)», производства Beijing Meizheng Bio-Tech Co, LTD, Китай включает в себя все необходимое для 96 определений:

- 12 туб, каждая из которых содержит 1 стрип с 8 лунками с реагентом и 8 тест – полосками;
- 100 одноразовых пипеток Пастера;
- 1 флакон Буфера для разбавления образца;
- 1 планшет для лунок;
- Инструкция.

5. Условия хранения

Тест-набор необходимо хранить в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С. Замораживать компоненты набора реагентов не допускается. Использование тест – набора с истекшим сроком годности не допускается.

6. Требования безопасности и требования квалификации операторов

6.1 Требования безопасности

При выполнении работ обслуживающий 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, изложенной в инструкциях по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при выполнении работ по данной методике.

6.2 Требования к квалификации персонала

К проведению работ по данной методике допускаются лица, прошедшие обучение приемам работы с тест – наборами, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой.

7. Условия выполнения анализа

При выполнении анализа должны соблюдаться следующие условия:

- температура окружающей среды от плюс 16 °С до плюс 25 °С;
- влажность окружающей среды не более 80% при температуре плюс 25 °С.

7.1 Отбор образцов

7.1.1 Образцы для анализа отбираются в соответствии с действующими ТНПА.

7.1.2 Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С в течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 20 °С в течение 14 дней. Перед проведением анализа замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С.

7.2 Подготовка лабораторной посуды

Используемая лабораторная посуда должна быть чистой либо одноразовой. После проведения анализа стеклянную посуду следует промыть в растворе специального моющего средства и промыть водопроводной водой, ополоснуть несколько раз дистиллированной водой и высушить. Стеклянную посуду, имеющую сильные загрязнения, следует предварительно промыть хромовой смесью.

Запрещается многократное использование одноразовой лабораторной посуды и использование бытовых моющих средств для мойки стеклянной лабораторной посуды.

8. Подготовка образцов для анализа

Доведите температуру образцов, отобранных в соответствии с п.7.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая их при комнатной температуре, после чего гомогенизируйте с помощью гомогенизатора. Исследуемые образцы мяса должны быть однородными.

От гомогенизированного образца мяса отберите навеску массой $5,0 \pm 0,1$ г. Поместите навеску в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 см³ и добавьте отмеренные микропипеткой 5 см³ дистиллированной воды. Содержимое пробирки перемешайте на вортексе на максимальной скорости 2 минуты.

Затем добавьте в пробирку отмеренные микропипеткой 7 см³ этилацетата. Содержимое пробирки перемешайте на вортексе на максимальной скорости 5 минут. И затем центрифугируйте пробирку с пробой в следующем режиме: 4000 об/мин, 5 минут.

После центрифугирования из пробирки отберите микропипеткой надосадочную жидкость объемом 4 см³, и перенесите её в стеклянную пробирку вместимостью 5 см³.

Выпарите этилацетат из пробирки на роторном испарителе при температуре плюс $60 \pm 5^\circ\text{C}$ до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирке добавьте отмеренный микропипеткой н-гексан объемом 2 см³. Затем добавьте отмеренные микропипеткой 450 мм³ буфера для разбавления образца. Перемешайте содержимое пробирки на вортексе на максимальной скорости 1 минуту. После чего содержимое перелейте в пробирку для центрифугирования вместимостью 10 см³.

Пробирку с пробой центрифугируйте в течение 3-х минут, 4000 об/мин.

После центрифугирования из пробирки удалите микропипеткой верхний органический слой.

Для последующей процедуры анализа пробы отберите микропипеткой нижний слой раствора в объеме 150 мм³.

Проба должна быть жидкой и однородной. В пробе не должно быть сгустков и фаз разделения образца. Температура пробы должна быть не ниже плюс 4 °C, не замороженная и не нагретая. Перед испытанием тщательно перемешайте пробу.

9. Проведение анализа

9.1 Подготовка

Компоненты набора, необходимые для анализа необходимо довести до комнатной температуры. Для этого достаньте необходимое количество компонентов набора из холодильника и оставьте при комнатной температуре нагреваться не менее 15 минут. Использовать данные компоненты необходимо в течение 24 часов с момента их нагревания. Не использованные компоненты набора должны храниться в холодильнике при температуре от плюс 2°C до плюс 8 °C.

При использовании инкубатора, заранее подключите инкубатор к сети и нагрейте его до плюс $40 \pm 3^\circ\text{C}$.

9.2. Проведение анализа

9.2.1 Поместите лунки с реагентом в предварительно нагретый до плюс $40 \pm 3^\circ\text{C}$ инкубатор или в планшет для лунок (при отсутствии инкубатора). Пипеткой перенесите в лунки тест – набора аликвоты проб объемом 150 мм³, подготовленных по п.8.

9.2.2 С помощью пипетки перемешайте (10-ти кратный набор и слив пробы из одноразовой пипетки Пастера) содержимое лунок. После перемешива-

ния смесь пробы и краситель из лунки должны иметь розовый цвет и однородную структуру. Инкубируйте смесь в течение 3-х минут.

9.2.3 Поместите тест-полоску нижней частью в лунку с пробой. Инкубируйте тест-полоску в течение 8-ми минут в инкубаторе, при плюс 40 ± 3 °С, или в планшете, в закрытом помещении при температуре окружающей среды от плюс 16 °С до плюс 25 °С.

9.2.4 Извлеките тест-полоску из лунки. Интерпретируйте результат в течение 3-х минут. Для хранения тест-полоски с результатом анализа удалите фильтры с обоих концов тест-полоски.

10. Получение результата анализа и его интерпретация

10.1 Получение результата анализа

Расположение указанных областей на тест – полоске приведено на рисунке 1.

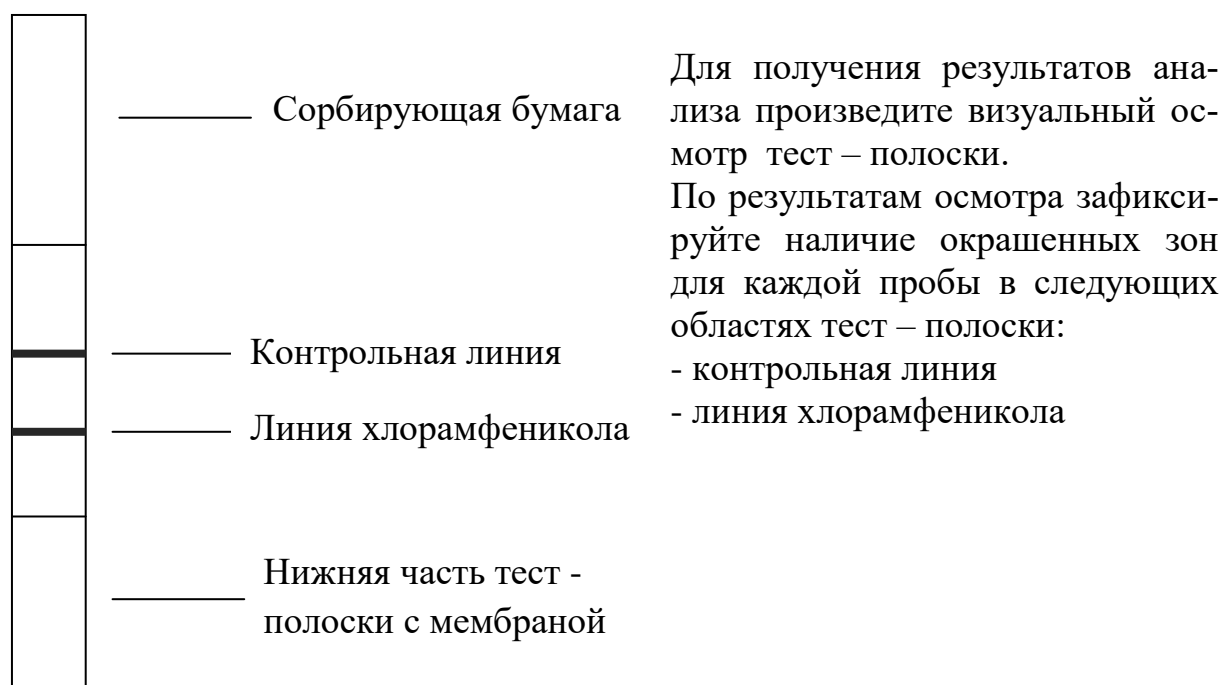


Рис. 1 Области тест – полоски

10.2 Интерпретация результатов.

10.2.1 Проведите интерпретацию полученных результатов анализов согласно таблице 2.

Таблица 2 Интерпретация результатов анализов

Наличие окраски линии		Результат анализа
Контрольная линия	Линия Хлорамфеникола	Хлорамфеникол
есть	есть	не обнаружен
есть	нет	обнаружен
нет	есть	Получен недействительный результат анализа
нет	нет	

Примечание: для линии хлорамфеникола «есть» означает наличие окраски соответствующей линии, более яркой, чем контрольная линия или одинаковая интенсивность окрашивания, «нет» означает отсутствие окраски или более слабая интенсивность окрашивания по сравнению с контрольной линией; «не обнаружено» означает получение отрицательного результата анализа по соответствующему антибиотику; «обнаружено» означает получение положительного результата анализа по соответствующему антибиотику.

На рисунке 2 приведены варианты окрашивания линий тест – полоски после проведения анализа.

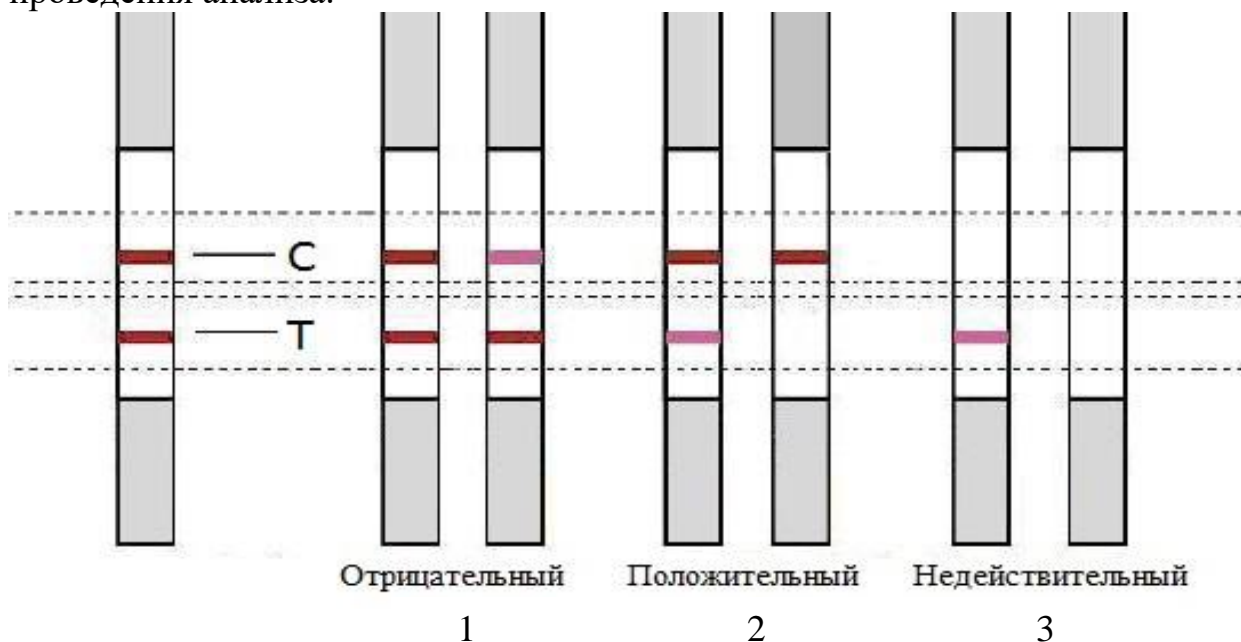


Рисунок 2. Варианты окрашивания линий тест – полосок после проведения анализа.

1 – отрицательный результат анализа по хлорамфениколу.

2 – положительный результат анализа по хлорамфениколу.

3 – недействительный результат анализа. Анализ следует повторить.

Примечание: отрицательный результат означает отсутствие антибиотика или концентрация антибиотика ниже предела обнаружения методики; положительный результат означает наличие антибиотика равно или выше предела обнаружения методики.

10.2.2 При наличии электронного считывающего устройства, произведите считывание результатов при помощи соответствующей программы. Результаты считывания будут храниться в памяти считывающего устройства. В дальнейшем они могут быть перенесены на ПК и выведены на печать (см. Инструкцию по эксплуатации считывающего устройства).

11. Форма предоставления результатов

При получении положительного результата обнаружения соответствующего антибиотика выдается результат в следующем виде с указанием значений предела обнаружения согласно таблице 1:

- хлорамфеникол обнаружен.

При получении отрицательного результата обнаружения соответствующего антибиотика выдается результат в следующем виде с указанием значений предела обнаружения согласно таблице 1:

- хлорамфеникол не обнаружен.

12. Внутренний контроль качества с использованием образцов для контроля.

Для проведения процедуры используйте положительный и отрицательный стандарты.

Приготовление отрицательного и положительного стандартов осуществляется согласно инструкции производителя.

Если полученные результаты обнаружения целевых антибиотиков соответствуют, то результат выполнения процедуры контроля качества признается удовлетворительным.

Таблица 3. Результаты анализа, соответствующие удовлетворительному проведению процедуры контроля качества

Результаты обнаружения антибиотика	Отрицательный контрольный образец	Положительный контрольный образец
хлорамфеникол	не обнаружен	обнаружен

При получении не удовлетворительного результата проведения процедуры контроля качества производится поиск и устранение причин его проведения. После устранения причин повторно выполняют процедуру контроля качества.

13. Минимальные требования к лаборатории при проведении валидации

При внедрении данной методики, в лаборатории необходимо провести валидацию методики.

Проведение валидации и оформление отчета должно выполняться в соответствии с документами системы менеджмента качества лаборатории.

При проведении валидации лаборатория определяет следующие характеристики:

- Не менее 20 проб, не содержащих целевые антибиотики должны показать долю ложноположительных результатов – 0 %.

- Не менее 20 проб, содержащих целевые антибиотики (группа тетрациклинов) на уровне предела обнаружения должны показать долю ложноотрицательных результатов не более 5 %.

14. Нормативные ссылки

ГОСТ 12.005-88	Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
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 1770-74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.
ГОСТ 6709-72	Вода дистиллированная. Технические условия.
ГОСТ 22300-76	Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия.
ГОСТ 24104-2001	Весы лабораторные. Общие технические требования.
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.
ГОСТ 28498-90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний.
СТБ 1036-97	Продукты пищевые и продовольственное сырьё. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.