

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ «ВНИМИ»)

УТВЕРЖДАЮ:

Врио директора ФГАНУ «ВНИМИ»

д.т.н.

Д.В. Харитонов
“ 01 ” 2019 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по определению наличия остаточного содержания антибиотиков
в молоке с применением тест-наборов «GARANT ULTRA»,
«GARANT 4 ULTRA MILK» и «GARANT QMLE» производства
компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай

Москва 2019

1 Область применения

Настоящие методические рекомендации распространяются на молоко сырое и устанавливают иммуноферментный метод одновременного определения наличия остаточного содержания следующих антибиотиков с применением тест-наборов «Garant ultra», «Garant 4 ultra milk» и «Garant QMLE» производства компании Ring Biotechnology Co Ltd (Китай):

- тест-набор «Garant ultra» по определению остаточного содержания в молоке антибиотиков β -лактамной и тетрациклиновой групп;

- тест-набор «Garant 4 ultra milk» по определению остаточного содержания в молоке антибиотиков β -лактамной и тетрациклиновой групп, стрептомицина и хлорамфеникола;

- тест-набор «Garant QMLE» по определению остаточного содержания в молоке антибиотиков групп хинолонов, макролидов, эритромицина и линкомицина.

2 Термины и определения

В настоящих рекомендациях приведены следующие термины и их определения:

2.1 метод иммуноферментного анализа: Иммунохимический метод определения низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция «антиген-антитело». Для выявления образовавшегося комплекса в качестве метки для регистрации сигнала применяют специфический для каждой реакции фермент или ферментзависимое вещество.

2.2 тест-система: Набор (комплект) специально подобранных реагентов (реактивов) и составных частей, предназначенный для определения одного или нескольких конкретных веществ.

3 Сущность метода

Метод основан на связывании антибиотиков, находящихся в анализируемом продукте, с антителами, вызывающими окрашиваемую иммунохроматографическую реакцию с последующим определением интенсивности окраски продуктов биохимической реакции визуальным методом или инструментально с помощью специального считывающего устройства – ридера.

Наличие антибиотиков устанавливают в результате сравнения интенсивности окрашивания зоны тест-полоски, соответствующей анализируемому продукту, с интенсивностью окрашивания контрольной зоны тест-полоски.

4 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:

температура окружающего воздуха	$(20 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$;
относительная влажность воздуха	$(55 \pm 25) \%$;
атмосферное давление	$(95 \pm 10) \text{ кПа}$.

5 Отбор проб и подготовка их к измерениям

Отбор проб и подготовка их к измерениям – по ГОСТ Р ИСО 707, ГОСТ 13928, ГОСТ 26809.1.

Если измерение не может быть проведено сразу после отбора проб, неконсервированные пробы хранят в холодильнике при температуре $(4 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ не более 36 часов.

Титруемая кислотность исследуемого молока сырого не должна превышать $21,0 \text{ }^\circ\text{T}$.

6 Определение наличия антибиотиков в молоке с применением тест-набора «Garant ultra» компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай

Тест-набор «Garant ultra» производства компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай, предназначен для одновременного определения наличия остаточного содержания антибиотиков β -лактамной и тетрациклиновой групп в молоке.

6.1 Требования к показателям точности измерений

Настоящая методика устанавливает следующие пределы обнаружения остаточного содержания антибиотиков в молоке.

Таблица 1

Наименование антибиотика	Предел обнаружения, мкг/дм ³
Антибиотики β-лактамной группы	
Пенициллин G	1,5
Ампициллин	3-4
Амоксициллин	3-4
Оксациллин	6
Клоксациллин	6
Диклоксациллин	4
Нафциллин	20-30
Цефкином	15-20
Цефацетрил	40-50
Цефалониум	2
Цефазолин	50
Цефапирин	10
Цефтиофур	90-100
Антибиотики тетрациклиновой группы	
Тетрациклин	2
Окситетрациклин	2
Доксициклин	3
Хлортетрациклин	3

6.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

Тест-набор «Garant ultra» для определения наличия остаточного содержания антибиотиков β -лактамной и тетрациклиновой групп в молоке производства компании Ring Biotechnology Co Ltd (Китай), включающий:

- пластины с микролунками, содержащими реагент;
- тест-полоски;
- планшет на 96 микролунок;
- микролунки, содержащие «Положительный контроль», включающий пенициллин G (1,5 мкг/кг) и тетрациклин (2 мкг/кг);
- микролунки, содержащие «Отрицательный контроль», включающий сухое молоко, свободное от антибиотиков;
- пипетки Пастера объемом дозирования 0,200 см³ или дозатор пипеточный (пипет-дозатор) фиксированного объема дозирования 0,200 см³ с наконечниками.

Считывающее устройство для тест-полосок Ankar-20 или Ankar-100 производства компании Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. (Китай).

Термометр лабораторный жидкостной диапазоном измерения от 0 до 100 °С, ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

Термостат-инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры (37,0±0,5)°С.

Баня водяная термостатируемая.

Стакан В-1-50, В-1-150 ТС по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные оплавленные.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

6.3 Подготовка к выполнению измерений

6.3.1 Перед использованием тест-набор вынимают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 15 мин, избегая воздействия влаги и солнечного света.

6.3.2 На всех этапах проведения измерений необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

6.3.3 Подготовка термостата-инкубатора к работе

Подготовку, вывод прибора на режим, проводят в соответствии с Инструкцией, прилагаемой к прибору. Температуру термостата-инкубатора устанавливают $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

6.4 Выполнение измерений

Пробу анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1 (пункт 3.14).

6.4.1 Выполнение измерений без применения термостата-инкубатора

6.4.1.1 Из тубы извлекают необходимое количество микролунок и устанавливают их в ячейки планшета.

При помощи пипетки или пипет-дозатора с одноразовым наконечником, отбирают $0,200 \text{ см}^3$ анализируемого молока, подготовленного по п.5, и переносят в микролунки, содержащие реагент. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования образца с реагентом и выдерживают в течение 3 минут.

6.4.1.2 Из тубы извлекают необходимое количество тест-полосок, не касаясь области контрольной/тестовой линии, после чего тубу сразу же закрывают.

Тест-полоски помещают в микролунки, направляя отметкой с обозначением «МАХ» в лунку, и выдерживают в течение 7 минут.

По окончании инкубирования тест-полоски вынимают из микролунок и снимают с них подложки. После этого необходимо интерпретировать результат не позднее 15 минут после завершения анализа.

6.4.2 Выполнение измерений с применением термостата-инкубатора

6.4.2.1 Из тубы извлекают необходимое количество микролунок и устанавливают их в ячейки термостата-инкубатора, подготовленного к работе по 6.3.3.

При помощи пипетки или пипет-дозатора с одноразовым наконечником отбирают 0,200 см³ анализируемого молока, подготовленного по п.5, и переносят в микролунки, содержащие реагент. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования образца с реагентом, на термостате-инкубаторе нажимают кнопку «START» и выдерживают 3 минуты до подачи звукового сигнала.

6.4.2.2 Из тубы извлекают необходимое количество тест-полосок, не касаясь области контрольной/тестовой линии, после чего тубу сразу же закрывают.

Тест-полоски помещают в микролунки, направляя отметкой с обозначением «MAX» в лунку, на термостате-инкубаторе нажимают кнопку «START» и выдерживают 7 минут до подачи звукового сигнала.

По окончании инкубирования тест-полоски вынимают из микролунок и снимают с них подложки. После этого необходимо интерпретировать результат незамедлительно, но не позднее 15 минут после завершения анализа.

Примечание – Не допускается смешивание компонентов набора из разных партий. Не допускается использование тест-наборов по окончании срока годности.

6.4.3 Проведение контрольного измерения

6.4.3.1 Контрольные измерения проводят для подтверждения чувствительности и контроля качества тест-наборов, используя «Положительный» и «Отрицательный» контрольные образцы.

6.4.3.2 В ячейки планшета устанавливают микролунки с контрольными образцами «Положительный контроль» и/или «Отрицательный контроль» и микролунки с реагентом.

6.4.3.3 В микролунки с контрольными образцами «Положительный контроль» и/или «Отрицательный контроль» вносят 0,200 см³ дистиллированной

воды. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования.

6.4.3.4 В микролунки с реагентом вносят $0,200 \text{ см}^3$ «Положительный контроль» или «Отрицательный контроль», приготовленный по 6.4.3.3. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования смеси реагентов и выдерживают в течение 3 минут.

6.4.3.5 Далее проводят измерение согласно 6.4.1.2.

6.5 Обработка результатов измерений

6.5.1 Интерпретация результатов анализа проводится визуально путем сравнения интенсивности окрашивания тестовых линий, соответствующих антибиотикам β -лактамной и тетрациклиновой групп на тест-полоске, по отношению к контрольной линии.

Вид тест-полоски с действительным результатом визуальной оценки анализа приведен на рисунке 1.

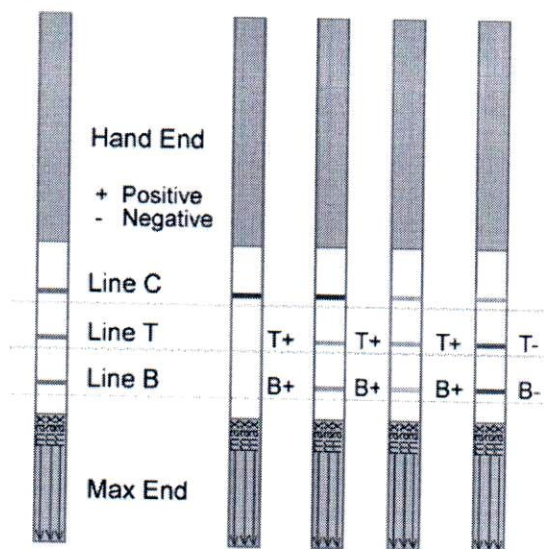


Рисунок 1 – Вид тест-полоски с действительным результатом визуальной оценки анализа

Линия С – контрольная линия;

Линия В – соответствует антибиотикам β -лактамной группы;

Линия Т – соответствует антибиотикам тетрациклиновой группы.

Верхняя контрольная линия (линия С) должна проявляться всегда. Если контрольная линия отсутствует, размыта, неровная или неравномерно окрашена,

результат анализа считается недействительным. В этом случае проводят повторное измерение с новыми тест-полосками.

Зона определения антибиотиков (тестовые линии В и Т) на тест-полоске расположена под контрольной линией (линия С). Тестовая линия В соответствует антибиотикам β -лактамной группы, тестовая линия Т соответствует антибиотикам тетрациклиновой группы.

Если тестовые линии, соответствующие антибиотикам β -лактамной и тетрациклиновой групп, окрашены в более интенсивный цвет по сравнению с контрольной линией, результат анализа считается отрицательным, что свидетельствует об отсутствии антибиотиков в анализируемом продукте или о содержании антибиотиков в концентрации, меньшей предела обнаружения метода.

Если интенсивность окрашивания тестовых линий и контрольной линии одинакова, либо тестовые линии окрашены менее интенсивно по сравнению с контрольной линией, результат анализа считается положительным, что свидетельствует о наличии антибиотиков в анализируемом продукте в концентрации, большей предела обнаружения метода.

Если тестовые линии, соответствующие антибиотикам, отсутствуют, результат анализа считается положительным, что свидетельствует о наличии антибиотиков в анализируемом продукте в концентрации, большей предела обнаружения метода.

6.5.2 Обработка результатов измерений с применением считывающего устройства для тест-полосок

Тест-полоску помещают в считывающее устройство и проводят обработку результатов согласно инструкции, прилагаемой к устройству.

Результаты анализа выводятся на дисплей считывающего устройства и сохраняются в памяти прибора.

Если проба анализируемого продукта определена как отрицательная, программное обеспечение отображает значение «Отр». Это означает, что антибиотики в анализируемом продукте отсутствуют или их содержание менее

предела обнаружения.

Если проба анализируемого продукта определена как положительная, программное обеспечение отображает «Пол». Содержание определяемых антибиотиков в анализируемом продукте больше или равно пределу обнаружения.

6.6 Метрологические характеристики

Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков β -лактамной и тетрациклиновой групп в молоке с применением тест-набора «Garant ultra» компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай, приведены в таблице 1.

По результатам валидации тест-набора «Garant ultra» (Приложение А. Технический отчет по валидации тест-наборов «Garant Ultra», «Garant 4 Ultra milk» и «Garant QMLE») предел обнаружения остаточного содержания пенициллина G в молоке сыром составляют 0,2 мкг/кг, предел обнаружения остаточного содержания тетрациклина в молоке сыром составляют 0,3 мкг/кг.

7 Определение наличия антибиотиков в молоке с применением тест-набора «Garant 4 ultra milk» компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай

Тест-набор «Garant 4 ultra milk» производства компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай, предназначен для одновременного определения наличия остаточного содержания антибиотиков β -лактамной и тетрациклиновой групп, стрептомицина и хлорамфеникола в молоке.

7.1 Требования к показателям точности измерений

Настоящая методика устанавливает следующие пределы обнаружения остаточного содержания антибиотиков в молоке.

Таблица 2

Наименование антибиотика	Предел обнаружения, мкг/дм ³
Антибиотики β-лактамной группы	
Пенициллин G	1,5
Ампициллин	3-4
Амоксициллин	3-4
Оксациллин	6
Клоксациллин	6
Диклоксациллин	4
Нафциллин	20-30
Цефкином	15-20
Цефацетрил	40-50
Цефалониум	2
Цефапирин	10
Цефтиофур	90-100
Антибиотики тетрациклиновой группы	
Тетрациклин	2
Окситетрациклин	2
Доксициклин	3
Хлортетрациклин	3
Стрептомицин	60-80
Дигидрострептомицин	60-80
Хлорамфеникол	0,3

7.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

Тест-набор «Garant 4 ultra milk» для определения наличия остаточного содержания антибиотиков β-лактамной и тетрациклиновой групп,

стрептомицина и хлорамфеникола в молоке производства компании Ring Biotechnology Co Ltd (Китай), включающий:

- пластины с микролунками, содержащими реагент;
- тест-полоски;
- планшет на 96 микролунок;
- микролунки, содержащие «Положительный контроль», включающий пенициллин G (1,5 мкг/кг), тетрациклин (2 мкг/кг), стрептомицин (80 мкг/кг) и хлорамфеникол (0,3 мкг/кг);
- микролунки, содержащие «Отрицательный контроль», включающий сухое молоко, свободное от антибиотиков;
- пипетки Пастера объемом дозирования 0,200 см³ или дозатор пипеточный (пипет-дозатор) фиксированного объема дозирования 0,200 см³ с наконечниками.

Считывающее устройство для тест-полосок Ankar-20 или Ankar-100 производства компании Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. (Китай).

Термометр лабораторный жидкостной диапазоном измерения от 0 до 100 °С, с ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498.

Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

Термостат-инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры (37,0±0,5) °С.

Баня водяная термостатируемая.

Стакан В-1-50, В-1-150 ТС по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные оплавленные.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

7.3 Подготовка к выполнению измерений

7.3.1 Перед использованием тест-набор вынимают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 15 мин, избегая воздействия влаги и солнечного света.

7.3.2 На всех этапах проведения измерений необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

7.3.3 Подготовка термостата-инкубатора к работе

Подготовку, вывод прибора на режим, проводят в соответствии с Инструкцией, прилагаемой к прибору. Температуру термостата-инкубатора устанавливают $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

7.4 Выполнение измерений

Пробу анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1 (пункт 3.14).

7.4.1 Выполнение измерений без применения термостата-инкубатора

7.4.1.1 Из тубы извлекают необходимое количество микролунок и устанавливают их в ячейки планшета.

При помощи пипетки или пипет-дозатора с одноразовым наконечником, отбирают $0,200 \text{ см}^3$ анализируемого молока, подготовленного по 5, и переносят в микролунки, содержащие реагент. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования образца с реагентом и выдерживают в течение 3 минут.

7.4.1.2 Из тубы извлекают необходимое количество тест-полосок, не касаясь области контрольной/тестовой линии, после чего тубу сразу же закрывают.

Тест-полоски помещают в микролунки, направляя отметкой с обозначением «MAX» в лунку, и выдерживают в течение 7 минут.

По окончании инкубирования тест-полоски вынимают из микролунок и снимают с них подложки. После этого необходимо интерпретировать результат не позднее 15 минут после завершения анализа.

7.4.2 Выполнение измерений с применением термостата-инкубатора

7.4.2.1 Из тубы извлекают необходимое количество микролунок и устанавливают их в ячейки термостата-инкубатора, подготовленного к работе по 7.3.3.

При помощи пипетки или пипет-дозатора с одноразовым наконечником отбирают 0,200 см³ анализируемого молока, подготовленного по 5, и переносят в микролунки, содержащие реагент. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования образца с реагентом, на термостате-инкубаторе нажимают кнопку «START» и выдерживают 3 минуты до подачи звукового сигнала.

7.4.2.2 Из тубы извлекают необходимое количество тест-полосок, не касаясь области контрольной/тестовой линии, после чего тубу сразу же закрывают.

Тест-полоски помещают в микролунки, направляя отметкой с обозначением «MAX» в лунку, на термостате-инкубаторе нажимают кнопку «START» и выдерживают 7 минут до подачи звукового сигнала.

По окончании инкубирования тест-полоски вынимают из микролунок и снимают с них подложки. После этого необходимо интерпретировать результат незамедлительно, но не позднее 15 минут после завершения анализа.

Примечание – Не допускается смешивание компонентов набора из разных партий. Не допускается использование тест-наборов по окончании срока годности.

7.4.3 Проведение контрольного измерения

7.4.3.1 Контрольные измерения проводят для подтверждения чувствительности и контроля качества тест-наборов, используя «Положительный» и «Отрицательный» контрольные образцы.

7.4.3.2 В ячейки планшета устанавливают микролунки с контрольными образцами «Положительный контроль» и/или «Отрицательный контроль» и микролунки с реагентом.

7.4.3.3 В микролунки с контрольными образцами «Положительный контроль» и/или «Отрицательный контроль» вносят 0,200 см³ дистиллированной воды. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования.

7.4.3.4 В микролунки с реагентом вносят 0,200 см³ «Положительный контроль» или «Отрицательный контроль», приготовленный по 7.4.3.3. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования смеси реагентов и выдерживают в течение 3 минут.

7.4.3.5 Далее проводят измерение согласно 7.4.1.2.

7.5 Обработка результатов измерений

7.5.1 Интерпретация результатов анализа проводится визуально путем сравнения интенсивности окрашивания тестовых линий, соответствующих антибиотикам β-лактамной и тетрациклиновой групп, стрептомицину и хлорамфениколу на тест-полоске, по отношению к контрольной линии.

Вид тест-полоски с действительным результатом визуальной оценки анализа приведен на рисунке 2.

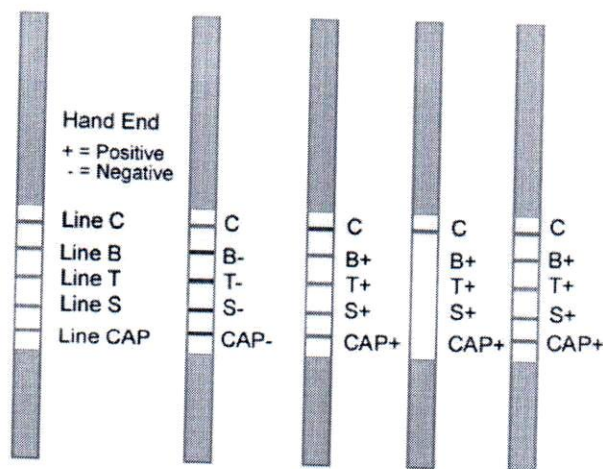


Рисунок 2 - Вид тест-полоски с действительным результатом визуальной оценки анализа

- Линия С – контрольная линия;
- Линия В – соответствует антибиотикам β-лактамной группы;
- Линия Т – соответствует антибиотикам тетрациклиновой группы;
- Линия S – соответствует стрептомицину;
- Линия CAP – соответствует хлорамфениколу.

Верхняя контрольная линия (линия С) должна проявляться всегда. Если контрольная линия отсутствует, размыта, неровная или неравномерно окрашена,

результат анализа считается недействительным. В этом случае проводят повторное измерение с новыми тест-полосками.

Зона определения антибиотиков (тестовые линии В, Т, S и CAP) на тест-полоске расположена под контрольной линией (линия С). Тестовая линия В соответствует антибиотикам β -лактамной группы, тестовая линия Т соответствует антибиотикам тетрациклиновой группы, тестовая линия S соответствует стрептомицину, тестовая линия CAP соответствует хлорамфениколу.

Если тестовые линии, соответствующие антибиотикам β -лактамной и тетрациклиновой групп, стрептомицину и хлорамфениколу, окрашены в более интенсивный цвет по сравнению с контрольной линией, результат анализа считается отрицательным, что свидетельствует об отсутствии антибиотиков в анализируемом продукте или о содержании антибиотиков в концентрации, меньшей предела обнаружения метода.

Если интенсивность окрашивания тестовых линий и контрольной линии одинакова, либо тестовые линии окрашены менее интенсивно по сравнению с контрольной линией, результат анализа считается положительным, что свидетельствует о наличии антибиотиков в анализируемом продукте в концентрации, большей предела обнаружения метода.

Если тестовые линии, соответствующие антибиотикам, отсутствуют, результат анализа считается положительным, что свидетельствует о наличии антибиотиков в анализируемом продукте в концентрации, большей предела обнаружения метода.

7.5.2 Обработка результатов измерений с применением считывающего устройства для тест-полосок

Тест-полоску помещают в считывающее устройство и проводят обработку результатов согласно инструкции, прилагаемой к устройству.

Результаты анализа выводятся на дисплей считывающего устройства и сохраняются в памяти прибора.

Если проба анализируемого продукта определена как отрицательная,

программное обеспечение отображает значение «Отр». Это означает, что антибиотики в анализируемом продукте отсутствуют или их содержание менее предела обнаружения.

Если проба анализируемого продукта определена как положительная, программное обеспечение отображает «Пол». Содержание определяемых антибиотиков в анализируемом продукте больше или равно пределу обнаружения.

7.6 Метрологические характеристики

Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков β -лактамной и тетрациклиновой групп, стрептомицина и хлорамфеникола в молоке с применением тест-набора «Garant 4 ultra milk» компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай, приведены в таблице 2.

По результатам валидации тест-набора «Garant 4 ultra milk» (Приложение А. Технический отчет по валидации тест-наборов «Garant Ultra», «Garant 4 Ultra milk» и «Garant QMLE») предел обнаружения остаточного содержания пенициллина G в молоке сыром составляют 0,1 мкг/кг, предел обнаружения остаточного содержания тетрациклина в молоке сыром составляют 0,2 мкг/кг, предел обнаружения остаточного содержания стрептомицина в молоке сыром составляют 2,5 мкг/кг, предел обнаружения остаточного содержания хлорамфеникола в молоке сыром составляют 0,02 мкг/кг.

8 Определение наличия антибиотиков в молоке с применением тест-набора «GARANT QMLE» компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай

Тест-набор «Garant QMLE» производства компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай, предназначен для одновременного определения наличия остаточного содержания антибиотиков групп хинолонов, макролидов, эритромицина и линкомицина в молоке.

8.1 Требования к показателям точности измерений

Настоящая методика устанавливает следующие пределы обнаружения остаточного содержания антибиотиков в молоке.

Таблица 3

Наименование антибиотика	Предел обнаружения, мкг/дм ³
Антибиотики группы хинолонов	
Энрофлоксацин	8-10
Даннофлоксацин	8-12
Флюмеквин	40-50
Дифлоксацин	20
Норфлоксацин	8
Оксолиновая кислота	70-90
Марбофлоксацин	10
Эноксацин	25
Сарафлоксацин	55
Офлоксацин	20
Ципрофлоксацин	6-8
Пефлоксацин	20
Ломефлоксацин	10-15
Флеороксацин	20
Антибиотики группы макролидов	
Тилмикозин	50
Тилозин	5
Эритромицин	3
Линкомицин	2

8.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений,

вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

Тест-набор «Garant QMLE» для определения наличия остаточного содержания антибиотиков групп хинолонов, макролидов, эритромицина и линкомицина в молоке производства компании Ring Biotechnology Co Ltd (Китай), включающий:

- пластины с микролунками, содержащими реагент;
- тест-полоски;
- планшет на 96 микролунок;
- микролунки, содержащие «Положительный контроль», включающий линкомицин (2 мкг/кг), тилозин (5 мкг/кг), норфлоксацин (8 мкг/кг), эритромицин (3 мкг/кг);
- микролунки, содержащие «Отрицательный контроль», включающий сухое молоко, свободное от антибиотиков;
- пипетки Пастера объемом дозирования 0,200 см³ или дозатор пипеточный (пипет-дозатор) фиксированного объема дозирования 0,200 см³ с наконечниками.

Считывающее устройство для тест-полосок Ankar-20 или Ankar-100 производства компании Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. (Китай).

Термометр лабораторный жидкостной диапазоном измерения от 0 до 100 °С, ценой деления шкалы 1°С по ГОСТ 28498.

Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

Термостат-инкубатор, обеспечивающий поддержание температуры (37,0±0,5) °С.

Баня водяная термостатируемая.

Стакан В-1-50, В-1-150 ТС по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные оплавленные.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

8.3 Подготовка к выполнению измерений

8.3.1 Перед использованием тест-набор вынимают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 15 мин, избегая воздействия влаги и солнечного света.

8.3.2 На всех этапах проведения измерений необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

8.3.3 Подготовка термостата-инкубатора к работе

Подготовку, вывод прибора на режим, проводят в соответствии с Инструкцией, прилагаемой к прибору. Температуру термостата-инкубатора устанавливают $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

8.4 Выполнение измерений

Пробу анализируют два раза в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1 (пункт 3.14).

8.4.1 Выполнение измерений без применения термостата-инкубатора

8.4.1.1 Из тубы извлекают необходимое количество микролунок и устанавливают их в ячейки планшета.

При помощи пипетки или пипет-дозатора с одноразовым наконечником, отбирают $0,200 \text{ см}^3$ анализируемого молока, подготовленного по 5, и переносят в микролунки, содержащие реагент. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования образца с реагентом и выдерживают в течение 3 минут.

8.4.1.2 Из тубы извлекают необходимое количество тест-полосок, не касаясь области контрольной/тестовой линии, после чего тубу сразу же закрывают.

Тест-полоски помещают в микролунки, направляя отметкой с обозначением «MAX» в лунку, и выдерживают в течение 7 минут.

По окончании инкубирования тест-полоски вынимают из микролунок и снимают с них подложки. После этого необходимо интерпретировать результат не позднее 15 минут после завершения анализа.

8.4.2 Выполнение измерений с применением термостата-инкубатора

8.4.2.1 Из тубы извлекают необходимое количество микролунок и устанавливают их в ячейки термостата-инкубатора, подготовленного к работе по 8.3.3.

При помощи пипетки или пипет-дозатора с одноразовым наконечником отбирают 0,200 см³ анализируемого молока, подготовленного по п.5, и переносят в микролунки, содержащие реагент. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования образца с реагентом, на термостате-инкубаторе нажимают кнопку «START» и выдерживают 3 минуты до подачи звукового сигнала.

8.4.2.2 Из тубы извлекают необходимое количество тест-полосок, не касаясь области контрольной/тестовой линии, после чего тубу сразу же закрывают.

Тест-полоски помещают в микролунки, направляя отметкой с обозначением «MAX» в лунку, на термостате-инкубаторе нажимают кнопку «START» и выдерживают 7 минут до подачи звукового сигнала.

По окончании инкубирования тест-полоски вынимают из микролунок и снимают с них подложки. После этого необходимо интерпретировать результат незамедлительно, но не позднее 15 минут после завершения анализа.

Примечание – Не допускается смешивание компонентов набора из разных партий. Не допускается использование тест-наборов по окончании срока годности.

8.4.3 Проведение контрольного измерения

8.4.3.1 Контрольные измерения проводят для подтверждения чувствительности и контроля качества тест-наборов, используя «Положительный» и «Отрицательный» контрольные образцы.

8.4.3.2 В ячейки планшета устанавливают микролунки с контрольными образцами «Положительный контроль» и/или «Отрицательный контроль» и микролунки с реагентом.

8.4.3.3 В микролунки с контрольными образцами «Положительный контроль» и/или «Отрицательный контроль» вносят 0,200 см³ дистиллированной воды. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования.

8.4.3.4 В микролунки с реагентом вносят 0,200 см³ «Положительный контроль» или «Отрицательный контроль», приготовленный по 8.4.3.3. Содержимое микролунок перемешивают путем десятикратного пипетирования смеси реагентов и выдерживают в течение 3 минут.

8.4.3.5 Далее проводят измерение согласно 8.4.1.2.

8.5 Обработка результатов измерений

8.5.1 Интерпретация результатов анализа проводится визуально путем сравнения интенсивности окрашивания тестовых линий, соответствующих антибиотикам групп хинолонов, макролидов, эритромицина и линкомицина на тест-полоске, по отношению к контрольной линии.

Вид тест-полоски с действительным результатом визуальной оценки анализа приведен на рисунке 3.

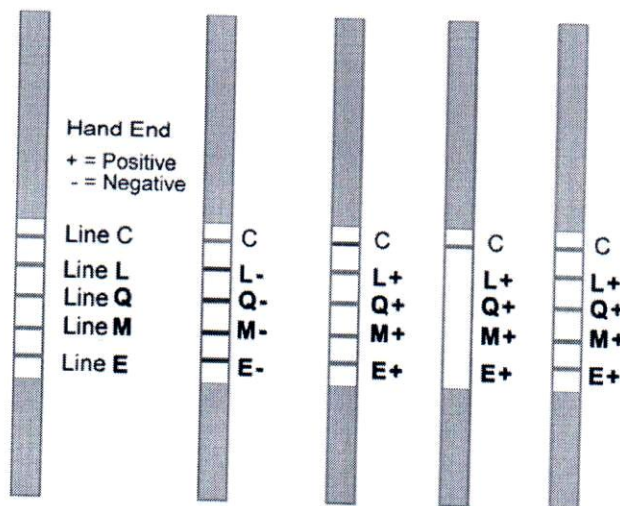


Рисунок 3 - Вид тест-полоски с действительным результатом визуальной оценки анализа

Линия С – контрольная линия;

Линия L – соответствует антибиотику линкомицину;

Линия Q – соответствует антибиотикам группы хинолонов;

Линия M – соответствует антибиотикам группы макролидов;

Линия E – соответствует антибиотику эритромицину.

Верхняя контрольная линия (линия C) должна проявляться всегда. Если контрольная линия отсутствует, размыта, неровная или неравномерно окрашена, результат анализа считается недействительным. В этом случае проводят повторное измерение с новыми тест-полосками.

Зона определения антибиотиков (тестовые линии L, Q, M и E) на тест-полоске расположена под контрольной линией (линия C). Тестовая линия L соответствует антибиотику линкомицину, тестовая линия Q соответствует антибиотикам группы хинолонов, тестовая линия M соответствует антибиотикам группы макролидов, тестовая линия E соответствует антибиотику эритромицину.

Если тестовые линии, соответствующие антибиотикам групп хинолонов, макролидов, эритромицину и линкомицину, окрашены в более интенсивный цвет по сравнению с контрольной линией, результат анализа считается отрицательным, что свидетельствует об отсутствии антибиотиков в анализируемом продукте или о содержании антибиотиков в концентрации, меньшей предела обнаружения метода.

Если интенсивность окрашивания тестовых линий и контрольной линии одинакова, либо тестовые линии окрашены менее интенсивно по сравнению с контрольной линией, результат анализа считается положительным, что свидетельствует о наличии антибиотиков в анализируемом продукте в концентрации, большей предела обнаружения метода.

Если тестовые линии, соответствующие антибиотикам, отсутствуют, результат анализа считается положительным, что свидетельствует о наличии антибиотиков в анализируемом продукте в концентрации, большей предела обнаружения метода.

8.5.2 Обработка результатов измерений с применением считывающего устройства для тест-полосок

Тест-полоску помещают в считывающее устройство и проводят обработку результатов согласно инструкции, прилагаемой к устройству.

Результаты анализа выводятся на дисплей считывающего устройства и сохраняются в памяти прибора.

Если проба анализируемого продукта определена как отрицательная, программное обеспечение отображает значение «Отр». Это означает, что антибиотики в анализируемом продукте отсутствуют или их содержание менее предела обнаружения.

Если проба анализируемого продукта определена как положительная, программное обеспечение отображает «Пол». Содержание определяемых антибиотиков в анализируемом продукте больше или равно пределу обнаружения.

8.6 Метрологические характеристики

Пределы обнаружения наличия остаточного содержания антибиотиков групп хинолонов, макролидов, эритромицина и линкомицина в молоке с применением тест-набора «Garant QMLE» компании Ring Biotechnology Co Ltd, Китай, приведены в таблице 3.

По результатам валидации тест-набора «Garant QMLE» (Приложение А. Технический отчет по валидации тест-наборов «Garant Ultra», «Garant 4 Ultra milk» и «Garant QMLE») предел обнаружения остаточного содержания линкомицина в молоке сыром составляют 0,3 мкг/кг, предел обнаружения остаточного содержания тилозина в молоке сыром составляют 0,7 мкг/кг, предел обнаружения остаточного содержания норфлоксацина в молоке сыром составляют 1,0 мкг/кг, предел обнаружения остаточного содержания эритромицина в молоке сыром составляют 0,5 мкг/кг.

9 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении измерений необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021.

Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных требованиями ГОСТ 12.1.005;

- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;

- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ Р 12.1.019;

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

10 Требования к квалификации оператора

Выполнение измерений может проводить специалист, имеющий специальное образование и освоивший метод в соответствии с требованиями настоящих Методических рекомендаций и Инструкцией по эксплуатации тест-наборов.