

## **Premi® Test**

**Арт. No. R3900 (100 тестов)**

**Арт. No. R3925 (25 тестов)**

Микробиологический скрининг-тест для обнаружения остатков антибиотиков в мясе, рыбе, креветках, яйцах, почках, печени, кормах, сыворотке и плазме животных

### **Состав набора:**

Ампулы с *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* в твердой агаризованной среде, одноразовые наконечники, защитная пленка, шприц.

### **Описание теста:**

Тест предназначен для скринингового качественного обнаружения антимикробных веществ, таких как остатки антибиотиков и сульфонамидов, в свежем мясе, кормах, рыбе и яйцах на уровне или ниже максимального допустимого уровня.

### **Принцип работы теста:**

Premi®Test основан на ингибировании роста бактерии *Bacillus stearothermophilus*, чувствительной ко многим антибиотикам и сульфамидным препаратам.

Стандартизированное количество спор помещают в агаровую среду с выбранными питательными веществами. Когда образец добавляется в тест и нагревается до 64°C, споры прорастают. При отсутствии ингибирующих веществ споры прорастают и образуют кислоты. В результате чего в ампуле происходит изменение цвета индикатора с фиолетового на желтый. Когда антимикробные вещества присутствуют в достаточном количестве (выше уровня обнаружения), рост спор не происходит, и цвет среды останется фиолетовым.

### **Внимание:**

Этот тест чрезвычайно чувствителен к антибиотикам и другим ингибирующим веществам, следует всегда избегать любого загрязнения такими материалами, рекомендуется тщательно вымыть руки перед началом процедуры тестирования. Используйте бумажную салфетку или чистое полотенце, чтобы высушить руки.

### **Пределы обнаружения теста (мкг/кг):**

|                                 |                                  |                         |
|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| амоксициллин - 5-15;            | хлортетрациклин - 100-1000;      | флорфеникол – 100-5000; |
| сульфаквиноксалин - <50- <100;  | окситетрациклин - 100-400;       | хлорамфеникол – 2500;   |
| сульфамеразин - 25- <100;       | тетрациклин - 50-200;            | триметоприм - 50;       |
| сульфаниламид - 25- <100;       | сульфахлоропиридазин - 25- <100; | наразин -1250;          |
| сульфаметоксипиридин – 25-<100; | сульфаметизол - <50- <100;       | ампролиум ->2000;       |
| сульфапиридин -<50 - <100;      | сульфаметоксазол - 25;           | фосфомицин - >1500;     |
| сульфадиметоксин – 25 - < 100;  | гентамицин – 100;                | ронидазол - >5000;      |
| сульфкванидин- 150-<200;        | стрептомицин -1000-3000;         | фуразолидон - >1500;    |
| сульфаметизол – 50-100;         | неомицин – 200-300;              | ласалоцид – 10000;      |
| сульфадиазин – 25-75;           | спектиномицин -5000;             | вирджиниамицин – 500;   |
| сульфаметазин -50-100;          | оксолиновая кислота - >10000;    | бацитрацин – 500;       |
| сульфатиазол – 25- <100;        | энрофлоксацин ->600;             | цинк-бацитрацин – 1250; |
| сульфизоксазол – 25-<100;       | линкомицин – 100;                | колистин - <1000;       |
| демеклоциклин – 50;             | тилмикозин – 50;                 | салиномицин – 1000;     |
| тилозин – 25 -50;               | спирамицин – 1000;               |                         |
| эритромицин – 50 – 100;         | ампициллин - 5;                  |                         |
| оксациллин - 100;               | пенициллин G – 2,5-5;            |                         |
| цефкином - 75-100;              | клоксациллин – 100- >100;        |                         |
| доксикалин - 100-200;           | флумеквин - >100;                |                         |
| цефтиофур - 100-400;            | монензин – 1250;                 |                         |
|                                 | авиламицин ->5000;               |                         |

## Положительный контроль макролипидов

Приготовление положительных контрольных образцов макролипидов на примере тилозина тартрата с конечной концентрацией 200 мкг/л (частей на миллиард). Другие макролипидные антибиотики и другие концентрации могут использоваться в пределах пределов обнаружения Premi®Test. Тем не менее, производство должно быть индивидуально адаптировано к соответствующим спецификациям.

*Реагенты и оборудование (для этой процедуры, которые не указаны в инструкции):*

- Тилозин тартрат
- Деминерализованная вода

*Процедура приготовления:*

1. Рассчитайте необходимое количество для взвешивания, как показано в примере для тилозина тартрата:

Молекулярные массы:

Тартрат тилозина (C<sub>46</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>17</sub>.C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>): 1066 г/моль; 100% чистота

Тилозин (C<sub>46</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>17</sub>): 916 г/моль

Тартрат (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>): 150 г/моль

$$\text{Поправ. коэф.} = \frac{\frac{1}{1 - \frac{M(\text{тартрата})}{M(\text{тилозина тартрата})}}}{\text{Чистота тилозина тартрата}} = \frac{\frac{1}{1 - \frac{150 \text{ г/моль}}{1066 \text{ г/моль}}}}{1} = 1,164 \text{ г/моль}$$

Вес = количество тилозина тартрата x поправочный коэффициент = 100 мг x 1,164 = 116,4 мг

2. Взвесьте 116,4 мг тилозина тартрата.

3. Добавьте деминерализованную воду до общего объема 100 мл и тщательно перемешайте. Сейчас концентрация составляет 1 000 000 мкг/л.

4. Перелейте 2 мл этого раствора в чистую емкость, добавьте деминерализованную воду до общего объема 100 мл и тщательно перемешайте. Сейчас концентрация 20 000 мкг/л.

5. Подготовьте образцы, как описано в соответствующем приложении, до тех пор, пока они не будут готовы к анализу с помощью Premi®Test.

6. Внесите в образцы концентрацию, превышающую предел обнаружения (LoD) Premi®Test для макролипидного антибиотика, используемого в соответствующей матрице (концентрация добавленной дозы > LoD).

*Пример:* чтобы приготовить образец с концентрацией 200 мкг/л, добавьте 50 мкл раствора 20 000 мкг/л тилозина тартрата к 5 мл образца. Также можно использовать другие объемы в соотношении 100:1 (99+1).

7. Аликвоты свежеприготовленных образцов положительного контроля кратны 100 мкл (например, 5 x 100 мкл = 500 мкл).

8. Храните образцы положительного контроля при температуре -20°C не более 6 месяцев. Срок годности может быть увеличен до 12 месяцев, если образцы хранятся при температуре -40°C. Не замораживайте образцы после оттаивания, так как это снижает действие антибиотика.

## Отрицательный контроль микролидов

Отрицательные контрольные образцы являются обязательными в качестве указания на правильное время инкубации для определения результатов. Используйте только те образцы, которые поддаются проверке и не содержат остатков антибиотиков. Используйте только свежие образцы для приготовления образцов отрицательного контроля. Перед началом процедуры вымойте руки и очистите рабочую поверхность.

### *Приготовление образцов:*

- Следуйте инструкциям по подготовке образцов согласно соответствующим указаниям по применению.
- Аликвотируйте образцы порциями в мультипликативном объеме 100 мкл (например, 5 x 100 мкл = 500 мкл).
- Выполните пробный запуск одного из этих образцов в соответствии с соответствующей инструкцией по применению.

### *Хранение образцов*

- Храните образцы в морозильной камере при температуре -20 °C (-4 °F) не более 6 месяцев.
- Срок хранения может быть увеличен до 12 месяцев, если образцы хранятся при температуре -40 °C (-40 °F).
- Не замораживайте и не размораживайте отрицательный контроль во второй раз.

## Положительный контроль β-лактама

В данной заявке описывается приготовление образцов положительного контроля β-лактама на примере пенициллина G в конечной концентрации 10 мкг/л (ppb). Другие β-лактамы и другие концентрации могут использоваться в соответствии с данными пределами обнаружения Premi®Test для β-лактамов, но расчет и процедура должны быть адаптированы к индивидуальным спецификациям.

### *Реагенты:*

- Пенициллин G калия
- Деминерализованная вода

### *Приготовление:*

1. Рассчитайте количество для начального веса следующим образом на примере пенициллина G калия:

Молекулярные массы:

Пенициллин G калия (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>KN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S): 372,5 г/моль; 100% чистота

Пенициллин G (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S): 334,4 г/моль

Калий (K): 39,1 г/моль

$$\text{Поправ. коэф.} = \frac{\frac{1}{1 - \frac{M(\text{калия})}{M(\text{пенициллин G калия})}}}{\text{Чистота тилозина калия}} = \frac{\frac{1}{1 - \frac{39,1 \text{ г/моль}}{372,5 \text{ г/моль}}}}{1} = 1,117 \text{ г/моль}$$

Исходный вес = количество пенициллина G x поправочный коэффициент = 10 мг x 1,117 = 11,17 мг

2. Взвесьте 11,17 мг пенициллина G калия.

3. Добавьте деминерализованную воду до конечного объема 100 мл и хорошо перемешайте, чтобы получить концентрацию 100 000 мкг/л.

4. Перенесите 1 мл этого раствора в новый контейнер и добавьте деминерализованную воду до конечного объема 100 мл, чтобы получить исходный раствор с концентрацией 1000 мкг/л.

5. Подготовьте образцы, как описано в соответствующих указаниях по применению, до тех пор, пока они не будут готовы к анализу с помощью Premi®Test.

6. Внесите в образец концентрацию, превышающую предел обнаружения Premi®Test (LoD) для соответствующего β-лактамного антибиотика и матрицы (концентрация добавленного вещества > LoD).

*Пример:* чтобы получить концентрацию 10 мкг/л в образце, добавьте в 5 мл образца 50 мкл исходного раствора с концентрацией 1000 мкг/л. Вы также можете использовать другие количества в соотношении 100:1 (99+1).

7. Аликвотируйте образцы порциями в мультипликативном объеме 100 мкл (например, 5 x 100 мкл = 500 мкл).

8. Храните образцы в морозильной камере при температуре -20 °C (-4 °F) не более 6 месяцев. Срок годности может быть увеличен до 12 месяцев, если образцы хранятся при температуре -40 °C (-40 °F). Не замораживайте и не оттаивайте образец положительного контроля во второй раз, так как это приведет к инаktivации активности антибиотика.

### **Положительный контроль сульфониламида**

Приготовление сульфонамидных образцов положительного контроля на примере сульфадиазина в конечной концентрации 400 мкг/л (ppb). Другие сульфаниламиды и другие концентрации могут использоваться в соответствии с данными пределами обнаружения Premi®Test для сульфаниламидов, но расчет и процедура должны быть адаптированы к индивидуальным спецификациям.

#### *Реагенты:*

- Сульфадиазин натрия
- Деминерализованная вода

#### *Приготовление:*

1. Рассчитайте количество для исходной массы следующим образом на примере сульфадиазина натрия:

Молекулярные массы:

Сульфадиазин натрия (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>2</sub>S): 272,3 г/моль; 99% чистота

Сульфадиазин (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>2</sub>S): 249,3 г/моль

Натрий (Na): 23 г/моль

$$\text{Поправ. коэф.} = \frac{1 - \frac{M(\text{натрия})}{M(\text{сульфадиазина натрия})}}{\text{Чистота сульфадиазина натрия}} = \frac{1 - \frac{23 \text{ г/моль}}{272,3 \text{ г/моль}}}{0,99} = 1,103 \text{ г/моль}$$

Исходный вес = количество пенициллина G x поправочный коэффициент = 10 мг x 1,117 = 11,17 мг

2. Отвешивают 110,3 мг сульфадиазина натрия.

3. Добавьте деминерализованную воду до конечного объема 100 мл и хорошо перемешайте (концентрация 1 000 000 мкг/л).

4. Перенесите 4 мл этого раствора в новый контейнер и добавьте деминерализованную воду до конечного объема 100 мл, чтобы получить исходный раствор с концентрацией 40 000 мкг/л.

5. Подготовьте образцы, как описано в соответствующих указаниях по применению, до тех пор, пока они не будут готовы к анализу с помощью Premi®Test.

6. Внесите в пробу концентрацию, превышающую предел обнаружения Premi®Test (LoD) для соответствующего сульфонамидного антибиотика и матрицы (концентрация добавленной дозы > LoD).

*Пример:* чтобы получить концентрацию 400 мкг/л в образце, добавьте в 5 мл образца 50 мкл исходного раствора с концентрацией 40 000 мкг/л. Вы также можете использовать другие количества в соотношении 100:1 (99+1).

7. Аликвотируйте образцы порциями в мультипликативном объеме 100 мкл (например, 5 x 100 мкл = 500 мкл).

8. Храните образцы в морозильной камере при температуре -20 °C (-4 °F) не более 6 месяцев. Срок годности может быть увеличен до 12 месяцев, если образцы хранятся при температуре -40 °C (-40 °F). Не замораживайте и не оттаивайте образец положительного контроля во второй раз, так как это приведет к инаktivации активности антибиотика.

### **Положительный контроль тетрациклина**

В данной заявке описывается приготовление образцов положительного контроля тетрациклина на примере окситетрациклина в конечной концентрации 400 мкг/л (ppb). Другие тетрациклины и другие концентрации могут использоваться в соответствии с данными пределами обнаружения Premi®Test для тетрациклинов, но расчет и процедура должны быть адаптированы к индивидуальным спецификациям.

*Реактивы:*

- Окситетрациклины
- Деминерализованная вода

*Приготовление образца:*

1. Рассчитайте количество для исходного веса следующим образом на примере окситетрациклина:

Молекулярные массы:

Окситетрациклины (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>·2H<sub>2</sub>O): 496,5 г/моль; 99% чистота

Тетрациклины (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>): 460,5 г/моль

Вода (2H<sub>2</sub>O): 36 г/моль

$$\text{Поправ. коэф.} = \frac{1 - \frac{M(\text{гидроксильной группы})}{M(\text{окситетрациклина})}}{\text{Чистота окситетрациклина}} = \frac{1 - \frac{23 \text{ г/моль}}{272,3 \text{ г/моль}}}{0,99} = 1,103 \text{ г/моль}$$

Исходный вес = количество окситетрациклина x поправочный коэффициент = 100 мг x 1089 = 108,9 мг

2. Взвешивают 108,9 мг окситетрациклина.

3. Добавьте деминерализованную воду до конечного объема 100 мл и хорошо перемешайте (концентрация 1 000 000 мкг/л).

4. Перенесите 4 мл этого раствора в новый контейнер и добавьте деминерализованную воду до конечного объема 100 мл, чтобы получить исходный раствор с концентрацией 40 000 мкг/л.

5. Подготовьте образцы, как описано в соответствующих указаниях по применению, до тех пор, пока они не будут готовы к анализу с помощью Premi®Test.

6. Добавьте в образец концентрацию, превышающую предел обнаружения Premi®Test (LoD) для соответствующего тетрациклинового антибиотика и матрицы (концентрация добавленного вещества > LoD).

*Пример:* чтобы получить концентрацию 400 мкг/л в образце, добавьте в 5 мл образца 50 мкл исходного раствора с концентрацией 40 000 мкг/л. Вы также можете использовать другие количества в соотношении 100:1 (99+1).

7. Аликвотируйте образцы порциями в мультипликативном объеме 100 мкл (например, 5 x 100 мкл = 500 мкл).

8. Храните образцы в морозильной камере при температуре -20 °C (-4 °F) не более 6 месяцев. Срок годности может быть увеличен до 12 месяцев, если образцы хранятся при температуре -40 °C (-40 °F). Не замораживайте и не оттаивайте образец положительного контроля во второй раз, так как это приведет к инаktivации активности антибиотика.

### **Инструкция по применению**

Перед проведением теста тщательно вымойте руки и очистите рабочую поверхность. Нагрейте набор до комнатной температуры.

Отрежьте необходимое количество ампул не повреждая алюминиевую фольгу соседних ампул.

Аккуратно снимите фольгу с необходимого количества ампул.

### **Определение антибиотиков в мясе**

#### *Подготовка образцов*

1. Возьмите около 2 см (4 г) нежирного мяса и, используя пресс, выдавите около 250 мкл мясного сока.

2. Отберите 100 мкл мясного сока и добавьте его в ампулу с агаром.

3. Оставьте пробирку на 20 минут при комнатной температуре для предварительной диффузии.

4. Промойте пробирку деминерализованной водой дважды, осторожно удалите воду из пробирки.

5. Закройте пробирку фольгой, избегая испарения в течение инкубации.

6. Инкубируйте ампулы при температуре 64°C±0,5°C в инкубаторе или на водяной бане приблизительно 3 часа. Извлеките ампулы из инкубатора после инкубации. Рекомендуется проводить исследования в параллелях используя отрицательный контроль. Интерпретировать результаты можно сразу после изменения окраски отрицательного контроля.

7. Оцените результат.

### **Определение антибиотиков в кормах**

#### *Подготовка образцов*

1. Измельчите образец корма.

2. Добавьте 30 мл дистиллированной воды к 10 г измельченного корма.

3. Перемешайте в течение 30 мин при температуре 20 - 25 °C путем встряхивания / вращения.

4. Центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / при комнатной температуре или профильтруйте через бумажный фильтр или осадите осадок при комнатной температуре до тех пор, пока не произойдет характерное фазовое расслоение.

5. Перелейте супернатант в новый чистый флакон.

#### *Процедура тестирования*

1. Отрежьте небольшую часть (1-2 мм) наконечника пипетки непосредственно перед использованием.

2. Перенесите 100 мкл испытуемого образца на агар в ампуле. Поставляемый шприц предназначен для автоматического набора требуемого объема 100 мкл. Используйте новый чистый наконечник пипетки на шприце для каждого образца и избегайте касания или повреждения агара во время пипетирования.

3. Герметичные ампулы с перфорированной пластиковой фольгой поставляются с Premi®Test.

4. Инкубируйте ампулы в течение 10 минут при 80 °C, а затем при  $64 \pm 0,5$  °C с помощью 2-шаговой программы Premi®Test на инкубаторе (поставляется со стартовым комплектом, арт.-№ ZPT-2000) или на водяной бане.

5. Когда отрицательный контроль изменит цвет с пурпурного на отчетливый желтый, результаты образцов можно будет прочесть. Считывайте результаты только с нижних 2/3 части агара.

6. Оцените результат.

### **Определение антибиотиков в рыбе**

#### *Подготовка образцов*

Существует 3 различных метода получения «сока» из рыбы, которые можно применять по отдельности или комбинировать в указанном порядке для увеличения объема рыбного сока.

1. Заморозьте рыбу в пакете с застежкой-молнией и разморозьте в течение ночи в холодильнике при 2-8 °C. Соберите выделившийся из рыбы сок.

2. Поместите порции примерно 25-50 г рыбы в пакет с застежкой-молнией и запечатайте. Поместите этот пакет во второй пакет с застежкой-молнией и также запечатайте. Инкубируйте пакет на водяной бане при 64 °C в течение 5 мин. Соберите выделившийся рыбный сок. Не используйте образцы, которые контактировали с водой. В этом случае приготовьте новые образцы!

3. Осторожно выдавите сок из рыбы (кусочек рыбы примерно 2 см<sup>3</sup>) прессом для мяса (входит в комплект Starter Kit, код продукта ZPT-2000), соберите выделившийся рыбный сок. Смешайте рыбный сок, полученный разными способами.

#### *Процедура тестирования*

1. Отрежьте необходимое количество ампул Premi®Test и снимите с ампул алюминиевую фольгу.

2. Перенесите 100 мкл рыбного сока на агар в ампуле. Входящий в комплект шприц автоматически набирает требуемый объем в 100 мкл. Используйте новый чистый наконечник пипетки на шприце для каждого образца, избегая прикосновения и повреждения агара во время дозирования.

3. Закройте ампулы перфорированной пластиковой фольгой, входящей в комплект Premi®Test.

4. Инкубируйте ампулы при  $64 \pm 0,5$  °C в инкубаторе Premi®Test (входит в комплект Starter Kit, код продукта ZPT-2000) или на водяной бане.

5. Когда отрицательный контроль изменил цвет с пурпурного на отчетливый желтый, результаты образцов можно будет прочесть. Время инкубации проб рыб составляет около 3 часов и может незначительно варьировать. Поэтому рекомендуется проверять цвет за 15 мин до истечения срока инкубации, а затем с интервалами в 5 минут до изменения цвета отрицательного контроля. Считывайте результаты только с нижних 2/3 части агара.

6. Оцените результат.

### **Определение антибиотиков в яйцах**

#### *Подготовка образцов*

Приготовьте однородную смесь яичного желтка и яичного белка.

#### *Процедура тестирования*

1. Отрежьте необходимое количество ампул Premi®Test и снимите с ампул алюминиевую фольгу.
2. Перед использованием отрежьте небольшую часть (1-2 мм) кончика дозатора.
3. Перенесите 100 мкл смешанного цельного яйца на агар в ампуле. Поставляемый шприц рассчитан на автоматический набор необходимого объема в 100 мкл. Используйте новый чистый наконечник на шприце для каждого образца и избегайте касания или повреждения агара во время дозирования.
4. Закройте ампулы перфорированной пластиковой фольгой, входящей в комплект Premi®Test.
5. Инкубируйте ампулы в течение 10 минут при 80 ° C, а затем при 64 ± 0,5 ° C, на инкубаторе Premi®Test, используя двухэтапную программу (входит в комплект Starter Kit, код продукта ZPT-2000) или на водяной бане.
6. Когда отрицательный контроль изменил цвет с пурпурного на отчетливый желтый, результаты образцов можно будет прочесть. Время инкубации проб яиц составляет около 2 часов 45 мин и может незначительно варьировать. Поэтому рекомендуется проверять цвет за 15 мин до истечения срока инкубации, а затем с интервалами в 5 минут до изменения цвета отрицательного контроля. Считывайте результаты только с нижних 2/3 части агара.

7. Оцените результат.

#### **Определение антибиотиков в печени**

##### *Подготовка образцов*

1. Измельчите печень до образования пасты.
2. Перенесите пасту в чистый флакон и разбавьте печеночную пасту деминерализованной водой в соотношении 1:(1 + 1).
3. Хорошо перемешайте до получения однородной смеси.

#### *Процедура тестирования*

1. Отрежьте необходимое количество ампул Premi®Test и снимите с ампул алюминиевую фольгу.
2. Отрежьте 1-2 мм кончика дозатора.
3. Перенесите 100 мкл печеночной пасты на агар в ампуле. Поставляемый в комплекте шприц рассчитан на автоматическое заполнение необходимого объема в 100 мкл. Используйте новый чистый наконечник пипетки на шприце для каждого образца, избегая касания и повреждения агара во время дозирования.
4. Инкубируйте ампулы в течение 20 минут при комнатной температуре.
5. Смойте пасту и дважды промойте ампулы деминерализованной водой.
6. Осторожно слейте оставшуюся воду. Поместите ампулы вверх дном на абсорбирующую матрицу. Не пытайтесь удалить воду из ампулы постукиванием.
7. Закройте ампулы перфорированной пластиковой фольгой, входящей в комплект Premi®Test.
8. Инкубируйте ампулы при 64±0,5 ° C в инкубаторе Premi®Test (входит в комплект Starter Kit, код продукта ZPT-2000) или на водяной бане с подогревом.
9. Отрицательный контроль (печень, которая поддается проверке, не содержит остатков антибиотиков). Перед началом процедуры вымойте руки и очистите рабочую поверхность. Предварительно подогрейте Premi®Test до комнатной температуры перед использованием.

Когда отрицательный контроль изменил цвет с пурпурного на отчетливый желтый, результаты образцов можно будет прочесть. Время инкубации проб составляет около 3 часов и может незначительно варьировать. Поэтому рекомендуется проверять цвет за 15 мин до истечения срока инкубации, а затем с интервалами в 5 минут до изменения цвета отрицательного контроля. Считывайте результаты только с нижних 2/3 части агара.

10. Оцените результат.

#### **Определение антибиотиков в почках**

##### *Подготовка образцов*

1. Разрежьте почку по горизонтали.
2. Возьмите кусок около 2 см<sup>3</sup> из мозгового вещества почки.
3. Отожмите образец почек с помощью пресса для мяса (входит в комплект Starter Kit, код продукта ZPT 2000) и соберите выделившийся «почечный сок».

##### *Процедура тестирования*

1. Отрежьте необходимое количество ампул Premi®Test и снимите с ампул алюминиевую фольгу.
2. Перенесите 100 мкл почечного сока на агар в ампуле. Поставляемый шприц предназначен для автоматического набора необходимого объема в 100 мкл. Используйте новый чистый наконечник пипетки на шприце для каждого образца и избегайте касания или повреждения агара при дозировании.
3. Закройте ампулы перфорированной пластиковой фольгой, входящей в комплект Premi®Test.
4. Инкубируйте ампулы в течение 10 минут при 80 °C, а затем при 64 ± 0,5 °C, на инкубаторе Premi®Test используя двухэтапную программу (входит в состав Starter Kit, код продукта ZPT-2000) или на водяной бане.
5. Когда отрицательный контроль изменил цвет с пурпурного на отчетливый желтый, результаты образцов можно будет прочесть. Время инкубации проб составляет около 3 часов и может незначительно варьировать. Поэтому рекомендуется проверять цвет за 15 мин до истечения срока инкубации, а затем с интервалами в 5 минут до изменения цвета отрицательного контроля. Считывайте результаты только с нижних 2/3 части агара.

6. Оцените результат.

#### **Определение антибиотиков в мёде**

Требуется тестирование отрицательных контролей, и настоятельно рекомендуется тестирование положительных контролей для проверки надлежащего выполнения теста.

##### *Процедура тестирования*

1. Хорошо гомогенизируйте образцы меда
2. Взвесьте 2 г образца в центрифужной пробирке с завинчивающейся чашкой.
3. Добавьте 5 мл ацетонитрила/ацетона (70/30 (об./об.))
4. Энергично перемешайте (Vortex) в течение 30–40 с.
5. Инкубируйте в течение 5 минут в звуковой ванне.
6. Энергично перемешайте (Vortex) в течение 30–40 с.
7. Центрифугируйте: 10 мин / 4000 г / 4 °C (39,2 °F); если нет охлаждающей центрифуги, поместите образцы в холодильник не менее чем на 15 минут перед центрифугированием при комнатной температуре (20–25 °C / 68–77 °F).

8. Перелейте верхнюю фазу в новый флакон и выпаривайте при 40–45 °C (104–113 °F) до прибл. 100 мкл остаточной жидкости

9. Восстановите остаток в 250 мкл бульона Lab Lemco с концентрацией 8 г/л.

10. Перенесите 100 мкл ампул Premi®Test на агар и закройте пластиковой пленкой, входящей в комплект (Примечание: предварительная инкубация и промывка не требуются).

11. Инкубируйте ампулы в инкубаторе Premi®Test или на водяной бане при температуре ок. 64°C (147,2 °F), пока цвет отрицательного контроля не изменится с фиолетового на желтый (примерно 3 ч).

12. Считайте результаты с нижней 2/3 части ампулы:

- Четкое изменение цвета с фиолетового на желтый указывает на то, что содержание противомикробных соединений ниже пределов обнаружения Premi®Test.

- Фиолетовый цвет указывает на присутствие антибактериальных веществ на уровне или выше пределов обнаружения Premi®Test.

### **Определение антибиотиков в креветках**

#### *Подготовка образцов*

Существует 3 различных метода получения «сока» из креветок. Методы можно выполнять по отдельности или комбинировать в указанном порядке для увеличения объема креветочного сока:

1. Заморозьте креветки в пакете с замком и разморозьте их в течение ночи в холодильнике при температуре 2–8 °C (35,6–46,4 °F). Соберите креветочный сок, выделившийся из креветок.

2. Поместите порции примерно по 25–50 г в пакет с застежкой-молнией и закройте. Поместите этот пакет во второй пакет с застежкой-молнией и также запечатайте. Инкубируйте пакеты на водяной бане при температуре 64 °C (147,2 °F) в течение 15 мин. Соберите выделившийся сок креветок. Не используйте образцы, которые попали в контакт с водой после утечки пакетов с застежкой-молнией. В этом случае подготовьте новые образцы.

3. Нажмите прибл. Аккуратно измельчите креветки объемом 2 см<sup>3</sup> с помощью пресса для мяса (входит в комплект Premi®Test Starter Kit, арт. № ZPT-2000) и соберите выделившийся сок креветок. Смешайте креветочный сок, полученный разными способами.

#### *Процедура анализа*

1. Отрежьте необходимое количество ампул Premi®Test и снимите с ампул алюминиевую фольгу.

2. Перенесите 100 мкл креветочного сока на агар в ампуле. Прилагаемый шприц предназначен для автоматического набора необходимого объема 100 мкл. Используйте новый чистый наконечник пипетки на шприце для каждого образца и избегайте касания или повреждения агара во время пипетирования.

3. Закройте ампулы перфорированной пластиковой пленкой, поставляемой с Premi®Test.

4. Инкубируйте ампулы в течение 10 минут при 80 °C (176 °F), а затем при 64 ± 0,5 °C (147,2 ± 0,9 °F), используя двухэтапную программу инкубатора Premi®Test (поставляется с ®Test Starter Kit, Артикул № ZPT-2000) или ванну с терпированной водой.

### **Анализ антибиотиков в сыворотке/плазме животных**

Использование крови в Premi®Test может привести к ложноположительным результатам из-за красного окрашивания теста. Имейте в виду, что кровь не является репрезентативной матрицей для уровней обнаружения в мясе.

#### *Подготовка образцов*

1. Вымойте руки перед использованием и обязательно используйте чистую рабочую поверхность.
2. Центрифугировать кровь в течение 10 мин при 3000 об/мин.
3. Взять 3 мл плазмы крови.
4. Добавьте 1 мл из ампулы «Premi®Test pre-treatment» (которая также используется для Premi®Test Urin).

5. Смешайте очень хорошо.

#### *Процедура анализа*

1. Аккуратно снимите алюминиевую фольгу с ампулы (ампул).
2. Используйте чистый наконечник на шприце.
3. Перенести 100 мкл смеси на агар в ампуле, однократно нажав на шприц и отпустив его. Он автоматически займет необходимый объем.
4. Закройте ампулы полиэтиленовой пленкой, входящей в комплект.
5. Инкубируйте Premi®Test при требуемой температуре 64 °C ( $\pm 0,5$  °C).
6. Инкубируйте образец до тех пор, пока отрицательный контроль (плазма крови, которая ранее была отрицательной) не изменит цвет.

#### *Результаты:*

1. Когда отрицательный контроль меняет цвет с фиолетового на ярко-желтый, можно интерпретировать результаты образцов. Инкубационный период составляет ок. 3 часа и может немного отличаться между запусками. Поэтому рекомендуется проверять цвет как минимум за 15 мин до и затем с интервалом в 5 мин, пока не изменится цвет отрицательного контроля. Считайте результаты только для нижних 2/3 части агара.

2. Четкое изменение цвета с фиолетового на желтый указывает на то, что образец не содержит остатков антибиотиков или что концентрация остатков антибиотиков ниже пределов обнаружения Premi®Test (LOD). Если цвет остается фиолетовым или если цвет образца явно отличается от цвета отрицательного контроля, образец содержит остатки антибиотиков в концентрации, превышающей пределы обнаружения Premi®Test (LOD).

#### **Интерпретация результатов теста:**

- интерпретируйте цвет только с нижней 2/3 части ампулы.
- четкое изменение цвета с пурпурного на желтый указывает на то, что образец не содержит остатков антибиотиков или что концентрация остатков антибиотиков ниже пределов обнаружения Premi®Test (LOD).
- если цвет остается пурпурным или если цвет образца отчетливо отличается от цвета отрицательного контроля, образец содержит остатки антибиотиков в концентрации, превышающей пределы обнаружения Premi®Test (LOD).

#### **Отрицательный контроль:**

Настоятельно рекомендуется использовать отрицательный контроль. Прочитайте результаты теста после того, как отрицательный контроль изменил цвет. Проверяйте цвет отрицательного контроля после инкубации 2 ч 40 мин и затем с интервалами в 5 мин, пока цвет отрицательного контроля не изменится с фиолетового на желтый. Если в течение 4 часов цвет отрицательного контроля не изменился – повторите тест. Отрицательный контроль может быть приготовлен путем замораживания и хранения образца гарантированно не содержащего антибиотиков. Никогда не используйте воду в качестве отрицательного контроля.

Храните образцы в морозильной камере при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 6 месяцев.

Срок годности может быть увеличен до 12 месяцев при хранении образцов при  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Не замораживать и не размораживать отрицательный контроль во второй раз.

***Положительный контроль:***

Рекомендуется регулярно проверять положительный контроль, чтобы оценить правильность применения теста.

**Хранение:** Ампулы должны храниться в холоде ( $3-10^{\circ}\text{C}$ ). **Не замораживать!**