



RIDASCREEN[®] Streptomycin

Art. Nr. R3104

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa
di streptomicina

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.de

Per informazioni

Telefono:

Centralino (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-mail:

Ordini (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing

(0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl
Via Morandi, 10
20077 Melegnano (MI)
Telefono 02 9823 3330
info@r-biopharm.it - www.r-biopharm.com

RIDA® e RIDASCREEN®
sono marchi registrati della R-BIOPHARM AG
Produttore: R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Germania

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001

RIDASCREEN[®] Streptomycin

Introduzione

RIDASCREEN[®] Streptomycin (Art. No.: R3104) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa della streptomicina in latte e latte in polvere, miele, carne, fegato, reni, gamberetti e succo di mela.

Tutti i reagenti richiesti per l'analisi immunoenzimatica – compresi gli standard – sono contenuti nel kit.

Il kit è sufficiente per 96 determinazioni (inclusi gli standard).

Per la quantificazione è richiesto uno spettrofotometro per micropiastre.

Preparazione campioni: latte: diluizione
latte in polvere: ricostituzione, diluizione
miele: estrazione, purificazione con RIDA[®] C18 column, evaporazione, ricostituzione
carne, fegato, reni, gamberetti: omogeneizzazione, estrazione, diluizione
succo di mela: centrifugazione, diluizione

Tempo richiesto: preparazione di 10 campioni

latte	ca. 5 min
latte in polvere	ca. 30 min
miele:	ca: 1.5 h
carne, fegato, reni, gamberetti.....	ca. 45 min
succo di mela	ca. 5 min
esecuzione del test.....	ca. 45 min

Limite di rilevabilità:	latte	ca. 5 µg/l (ppb)
(corrispondente alla	latte (ricostituito dal latte in polvere)	ca. 3 µg/l (ppb)
sostanza standard)	miele	ca. 2 µg/kg (ppb)
	manzo, suino.....	ca. 22 µg/kg (ppb)
	pollo	ca. 28 µg/kg (ppb)
	fegato	ca. 23 µg/kg (ppb)
	reni.....	ca. 18 µg/kg (ppb)
	gamberetti	ca. 20 µg/kg (ppb)
	succo di mela	ca. 4 µg/l (ppb)

Recupero:	latte	ca. 110%
(corrispondente alla	latte in polvere	ca. 107%
sostanza standard)	miele	ca. 87%
	manzo, suino	ca. 89%
	pollo	ca. 95%
	fegato	ca. 90%
	reni	ca. 81%)
	gamberetti	ca. 76%
	succo di mela	ca. 93%

La specificità di RIDASCREEN® Streptomycin è stata determinata analizzando i valori di cross-reattività delle sostanze corrispondenti in un sistema tampone. Nei campioni la specificità può differire da quella determinata in un sistema tampone a causa dell'effetto matrice. Prima dell'analisi delle sostanze cross-reattive, è necessario determinare il limite di rilevabilità ed i valori di recupero delle sostanze nel rispettivo campione. Il test non è in grado di discriminare tra analita e sostanza cross-reattiva.

Specificità:	streptomicina (sostanza standard).....	100 %
	diidrostreptomicina	ca. 69 %
	gentamicina, neomicina	
	spectinomicina, kanamicina.....	< 1%

Al fine di aumentare la qualità delle prestazioni durante l'esecuzione di procedure ELISA, si prega di far riferimento al nostro Good ELISA Practice (GEP) – Manual, nella versione aggiornata. Qui si elencano gli standard minimi riguardanti le condizioni di lavoro quando si utilizzano i kit di R-Biopharm AG e si eseguono test ELISA. Il manuale può essere visionato, stampato e scaricato direttamente dal nostro sito www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis

Prodotti correlati:

RIDA® Streptomycin Spiking Solution..... (R3199)

1. Scopo

RIDASCREEN® Streptomycin (Art. R3104) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa della streptomicina in latte e latte in polvere, miele, carne, fegato, reni, gamberetti e succo di mela.

2. Generale

Insieme agli antibiotici betalattamici per uso veterinario la streptomicina è uno degli antibiotici più utilizzati per il trattamento della mastite. E' possibile quindi trovare residui di streptomicina negli alimenti di origine animale qualora non si rispettino i tempi di ritenzione o si faccia un uso improprio dell'antibiotico. La streptomicina mostra ad elevate concentrazioni effetti ototossici e nefrotossici. Alle basse concentrazioni – come quelle che si ritrovano negli alimenti – può causare allergie, indebolire la flora intestinale e favorire lo sviluppo di microrganismi resistenti o patogeni. Per proteggere il consumatore da rischi per la salute ed evitare problemi tecnologici è necessaria l'adozione di un metodo semplice e sensibile per la rilevazione della streptomicina. Le normative dell'Unione Europea per la streptomicina stabiliscono i LMS (limite massimo del residuo) per la carne e il latte (tessuto muscolare ed epatico: 500 µg/kg, renale: 1000 µg/kg e, per il latte, 200 µg/l). Nel miele, i laboratori di riferimento della Comunità europea hanno determinato una-tolleranza zero con un limite minimo di prestazioni richiesto di $cc\beta = 40 \mu\text{g} / \text{kg}$ per i sistemi analitici.

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi di cattura diretti contro gli anticorpi anti-streptomicina. La micropiastra è già funzionalizzata con anticorpi anti- streptomicina, che si legano agli anticorpi di cattura immobilizzati. Si aggiungono gli standard oppure i campioni ai pozzetti. La streptomicina libera e quella coniugata con l'enzima competono per i siti di legame degli anticorpi (immunodosaggio enzimatico competitivo). Il coniugato non legato viene quindi rimosso con la fase di lavaggio. Il coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta del soluzione di stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione è fatta fotometricamente a 450 nm. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm. L'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di streptomicina nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 96 analisi (incluse le analisi degli standard). Ogni kit contiene:

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
Micropiastra	-	Pronto all'uso		96 pozzetti
Sample buffer	Bianco	Pronto all'uso		50 ml
Standard 1	Bianco	Pronto all'uso	0 µg/l	1.3 ml
Standard 2	Bianco	Pronto all'uso	0.5 µg/l	1.3 ml
Standard 3	Bianco	Pronto all'uso	1.5 µg/l	1.3 ml
Standard 4	Bianco	Pronto all'uso	4.5 µg/l	1.3 ml
Standard 5	Bianco	Pronto all'uso	13.5 µg/l	1.3 ml
Standard 6	Bianco	Pronto all'uso	40.5 µg/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Sali da sciogliere		
Conjugate	Rosso	Pronto all'uso		6 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Stop solution	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

Attrezzatura	latte (in polvere)	miele	carne, fegato, reni, gamberetti	succo di mela
spettrofotometro per micropiastre (450 nm)	•	•	•	•
pipette graduate	•	•	•	•
micropipette a volume variabile da 20 - 200 µl e da 200-1000 µl	•	•	•	•
vortex	•	•	•	•
centrifuga		•	•	
shaker		•	•	
mixer (stomacher, ultraturrax)			•	
evaporatore		•		

5.2. Reagenti:

Componente	miele
extraction buffer	•
PBS-buffer	•
100 % (v/v) methanol	•
RIDA® C18 column (Art. No. R2002)	•

–tampone di estrazione:

50 mM di acido eptano-solfonico con 25 mM di trisodiofosfato, pH 2.0:

2.0 g di acido eptano-solfonico (sale sodico) + 1,9 g di trisodiofosfato ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) portare a 200 mL con acqua distillata, regolando il pH a 2.0 con acido ortofosforico.

–tampone PBS:

0.55 g di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g di NaCl, portare a 1000 mL con acqua distillata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Questo test dovrebbe essere effettuato solo da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere rispettate rigorosamente.

Il kit può contenere sostanze pericolose. Per ulteriori informazioni sulla sostanze contenute, far riferimento alla scheda di sicurezza (MSDS) scaricabile direttamente online al sito www.r-biopharm.com

7. Conservazione

Conservare il kit a 2-8°C (35-46°F). Non congelare alcun componente del kit.

I pozzetti non utilizzati vanno riposti insieme all'essiccante nella loro confezione originale, che deve essere ben richiusa e conservata a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno è fotosensibile: evitarne l'esposizione alla luce diretta.

La garanzia di qualità non è valida oltre la data di scadenza riportata in etichetta.

Non scambiare i reagenti di kit appartenenti a lotti diversi.

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione bluastra della soluzione rossastra substrato/cromogeno prima dell'esecuzione del test
- Valori inferiori a 0,6 unità di assorbanza ($A_{450nm} < 0,6$) per lo standard zero

9. Preparazione dei campioni

I campioni vanno conservati in un luogo fresco.

9.1. Latte (crudo, fresco, pastorizzato, intero, scremato) e latte in polvere

- ricostituire il latte in polvere secondo le istruzioni del produttore
- diluire il latte 1:10 (1+9) con il tampone per il campione (ad esempio 50 µl di latte + 450 µl di tampone)
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.2. Miele

- preparare la miscela di metanolo/acqua distillata (vedi par. 5.2) per le colonne RIDA® C18 1 h prima dell'uso. Rimuovere le bolle d'aria utilizzando il vortex
- pesare 1 g di miele in un flacone e portare a 10 ml con il tampone di estrazione (vedi paragrafo 5.2.)
- agitare fino a completo scioglimento del miele
- centrifugare: 10 minuti a 3000 g e a temperatura ambiente (20 - 25 °) (dopo la centrifugazione, si deve ottenere un surnatante limpido)

Purificare l'estratto con le RIDA® C18 column (flusso: 1 goccia/sec):

- per il condizionamento, risciacquare la colonna RIDA® C18 con 2 ml di metanolo (100%) e poi con 2 ml di acqua distillata
- dopo il condizionamento, applicare 5 ml di surnatante e premere lentamente attraverso al colonna (circa 15 gocce/min).
- lavare la colonna con 3 ml di acqua distillata
- eliminare ogni eccesso di fluido flussando la cartuccia con aria o azoto (2 min)
- eluire lentamente il campione con 1 ml di metanolo al 100% (ca. 15 gocce/min)
- evaporare l'eluato fino a completo essiccamento a 60°C con leggero flusso di aria o azoto
- ricostituire il residuo secco in 2 ml di tampone PBS (vedi par. 5.2.)
- utilizzare 50 µL del liquido ottenuto per pozzetto

9.3. Campioni di carne (manzo, maiale, pollame), fegato, rene (suino e bovino) e gamberetti

- omogeneizzare completamente il campione (utilizzare stomacher, mixer oppure ultra turrax)
- miscelare 5 g di campione omogeneizzato con 20 mL di tampone PBS-Tween e vortexare per 10 s
- shakerare per 30 min
- centrifugare per 10 minuti a 4000 g e a temperatura ambiente (20-25°C)
- diluire una parte del surnatante 1:10 (1+9) con il tampone di lavaggio (ad esempio 50 µL di surnatante + 450 µL di tampone di lavaggio)
- utilizzare 50 µL del liquido ottenuto per ogni pozzetto

9.4. Succo di mela

- diluire il succo di mela o il surnatante ottenuto da un succo di mela non concentrato 1:10 (1+9) con il tampone per il campione (ad esempio 50 µL di succo di mela + 450 µL di tampone)
- utilizzare 50 µL del liquido ottenuto per ogni pozzetto

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Come **tampone di lavaggio** è necessario un tampone Tween PBS: utilizzare il sale di lavaggio contenuto nella busta inclusa nel kit (vedi cap. 4.). Sciogliere il contenuto in un litro di acqua distillata. Il tampone di lavaggio pronto all'uso scade dopo 4-6 settimane se conservato a 2-8°C.

In alternativa: Sciogliere il contenuto della busta in soli 100 ml di acqua distillata per ottenere un tampone di lavaggio concentrato 10 volte. Utilizzare una parte di questo concentrato e scioglierla in 9 parti di acqua distillata per ottenere la soluzione pronta all'uso. Questa soluzione concentrata 10 volte scade dopo 8-12 settimane se conservata a temperatura ambiente (20-25°C).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozzetti tra un passaggio e l'altro del test.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni ad essi assegnate.
2. Aggiungere 50 µL di ciascuna soluzione standard o di campione in pozzetti separati, in doppio
3. Introdurre 50 µL di coniugato in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 30 min a temperatura ambiente (20-25°C).
4. Svotare i pozzetti del liquido in essi contenuto e picchiettare energicamente il supporto della micropiastra per tre volte rovesciandolo su carta assorbente per ottenere la completa fuoriuscita del liquido dai pozzetti. Riempire tutti i pozzetti con 250 µL di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) e svotare nuovamente il liquido. Ripetere l'operazione altre due volte.
5. Aggiungere 100 µL di substrato/cromogeno in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 15 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C) al buio.
6. Aggiungere 100 µL di reagente d'arresto ad ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e leggere le assorbanze a 450 nm. Leggere entro 15 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

11. Risultati

Per i test immunoenzimatici RIDASCREEN[®], R-Biopharm ha elaborato un apposito software di valutazione, denominato RIDA[®]SOFT Win.net (Cod. Z9996).

Il profilo della curva standard è riportato nel certificato di assicurazione di qualità (Quality Assurance Certificate) incluso nel kit.

Nota per il calcolo in assenza di software:

$$\frac{\text{Assorbanza dello standard (o campione)}}{\text{Assorbanza standard 0}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

Lo standard zero è così uguale al 100% e i valori di assorbanza sono calcolati in percentuale. Inserire i valori calcolati per gli standard in un sistema di coordinate su scala semilogaritmica contro le concentrazioni di streptomycina espresse in [$\mu\text{g/l}$].

Per ottenere la concentrazione di streptomycina in $\mu\text{g/l}$ oppure $\mu\text{g/kg}$ effettivamente contenuta in un campione, moltiplicare la concentrazione letta sulla curva di calibrazione per il corrispondente fattore di diluizione. Operando secondo le procedure descritte, i fattori di diluizione sono:

latte	10
latte (ricostituito dal latte in polvere)	10
miele	4
carne, fegato, reni, gamberetti.....	50
succo di mela	10

R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.