



RIDASCREEN[®] Chloramphenicol

Art. Nr. R1511

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa
di cloramfenicolo

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[®] Chloramphenicol

Introduzione

RIDASCREEN[®] Chloramphenicol (Art. No.: R1511) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di cloramfenicolo in campioni di latte, latte in polvere, prodotti lattiero-caseari, miele e pappa reale, carne, pesce, gamberetti, uova, urine (compreso cloramfenicolo glucoronide), plasma/siero e mangimi.

Tutti i reagenti richiesti per il dosaggio immunoenzimatico - inclusi gli standard - sono contenuti nel kit. Il kit è sufficiente per l'esecuzione di 96 determinazioni (inclusi gli standard). Per la quantificazione è richiesto uno spettrofotometro per micropiastre.

Preparazione campioni: latte: uso diretto
 latte in polvere: ricostituzione o in alternativa:
 precipitazione, estrazione, evaporazione, ricostituzione
 yogurt, kefir, latticello, panna: precipitazione,
 estrazione, evaporazione, ricostituzione
 cagliata, panna acida: omogenizzazione, sgrassatura,
 estrazione, evaporazione, ricostituzione
 burro: sgrassatura, estrazione, evaporazione,
 ricostituzione
 formaggio: omogenizzazione, estrazione,
 evaporazione, ricostituzione
 miele: estrazione, evaporazione, ricostituzione
 pappa reale: estrazione evaporazione, ricostituzione
 carne, pesce, gamberetti, uova: omogenizzazione,
 estrazione, evaporazione, ricostituzione, sgrassatura
 urine: uso diretto oppure idrolisi, estrazione,
 evaporazione, ricostituzione
 plasma/siero: estrazione, evaporazione, ricostituzione
 mangimi: macinatura, estrazione, evaporazione,
 ricostituzione, sgrassatura

Tempo richiesto: preparazione campioni (10 campioni)
 a seconda della matrice da 5 min a 2 h
 esecuzione test (tempo di incubazione) 45 min

Limite di rilevabilità: (corrispondente alla sostanza standard)	latte ca. 24 ng/L
	latte in polvere (ricostituito) ca.240 ng/kg
	latte in polvere (estrazione) ca.24 ng/kg
	yogurt, kefir, latticello, panna.....ca.12 ng/kg
	cagliata, panna acida.....ca.15 ng/kg
	burro..... ca.61 ng/kg
	formaggio..... .ca.16 ng/kg
	miele..... ca.25 ng/kg
	pappa reale ca.23 ng/kg
	carne (manzo, suino, pollame) ca.5 ng/kg
	pesce ca.8 ng/kg
	gamberetti ca.8 ng/kg
	gamberetti (5 in 1 nitrofurano sample prep)..... ca.34 ng/kg
	uova ca.15 ng/kg
	urine, uso diretto (CAP-glucuronide)..... ca.138 ng/L
	urine, idrolizzate (cloramfenicolo) ca.196 ng/L
	plasma/siero..... ca.18 ng/L
	mangimi ca.107 ng/kg

Valori di recupero: (corrispondente alla sostanza standard)	latteca.93%
	latte in polvere (ricostituito)ca.101%
	latte in polvere (estrazione)ca.78%
	yogurt, kefir, latticello, panna.....ca.104%
	cagliata, panna acida.....ca.92%
	burro.....ca.82%
	formaggio.....ca.74%
	miele..... ca.106%
	pappa realeca.77%
	carne (manzo, suino, pollame)ca.91%
	pesceca.97%
	gamberettica.92%
	gamberetti (5 in 1 nitrofurano sample prep).....ca.98%
	uova ca.83%
	urine, uso diretto (CAP-glucuronide)..... ca.113%
	urine, idrolizzate (cloramfenicolo)ca.101%
	plasma/siero..... ca.96%
	mangimi ca.104%

La specificità di RIDASCREEN® Chloramphenicol 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:	Cloramfenicolo (RR-para-stereoisomero)	
In un sistema tampone	(sostanza standard).....	100%
	Dextramycin (SS-para-stereoisomero)	< 1%
	tutti gli altri stereoisomeri	non determinata
	Cloramfenicolo base.....	< 1%
	Florfenicolo.....	ca. 1.5 %
	Tiamfenicolo.....	< 0.1 %
	Nitrofurantoin, AHD, NP-AHD	< 1%
	Furaltadone, AMOZ, NP-AMOZ	< 1%
	Furazolidone, AOZ, NP-AOZ	< 1%
	Nitrofurazone, SEM, NP-SEM	< 1%
	Cloramfenicolo glucuronide	ca.68%

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® Chloramphenicol Spiking Solution..... (R1599)

1. Scopo

RIDASCREEN® Choramphenicol è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa del cloramfenicolo in latte, latte in polvere, prodotti lattiero-caseari, miele e pappa reale, carne, pesce, gamberetti, uova, urine (compreso cloramfenicolo glucoronide), plasma/siero e mangimi.

Nel settembre 1988 è stato autorizzato ufficialmente per la Germania un metodo di screening per i residui di cloramfenicolo nei campioni di latte (§64 LFGB 01.00 68). Il metodo è un test ELISA in formato a micropiastra.

2. Generale

Il cloramfenicolo è un antibiotico ad ampio spettro che viene frequentemente utilizzato nella produzione animale per le sue eccellenti proprietà antibatteriche e farmacocinetiche. Negli uomini, però, determina effetti collaterali ematotossici, in particolare la cosiddetta anemia aplastica indotta da cloramfenicolo, per la quale non è stata ancora stabilita alcuna relazione dose-effetto. Questo ha portato alla proibizione dell'utilizzo del cloramfenicolo per il trattamento di animali utilizzati per l'alimentazione umana. Per i sistemi analitici, è stato stabilito un limite minimo di rendimento richiesto di 300 ng/kg.

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con anticorpi diretti verso anticorpi anti-cloramfenicolo. La micropiastra è già funzionalizzata con anticorpi anti-cloramfenicolo, che si legano agli anticorpi di cattura immobilizzati. Vi si aggiungono ai pozzetti: standard oppure soluzioni campione e cloramfenicolo coniugato. Il cloramfenicolo libero e quello coniugato competono per i siti di legame anticorpali (saggio immunoenzimatico competitivo). Il coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Il coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta dello stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm. L'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di cloramfenicolo 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
Standard 1	Bianco	Pronto all'uso	0 ng/l	1.3 ml
Standard 2	Bianco	Pronto all'uso	25 ng/l	1.3 ml
Standard 3	Bianco	Pronto all'uso	50 ng/l	1.3 ml
Standard 4	Bianco	Pronto all'uso	100 ng/l	1.3 ml
Standard 5	Bianco	Pronto all'uso	250 ng/l	1.3 ml
Standard 6	Bianco	Pronto all'uso	750 ng/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Sali da sciogliere		
Conjugate	Rosso	Pronto all'uso		7.5 ml
Substrate/Chromogen	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 urine	latte in polvere, prodotti lattiero-caseari	miele	pappa reale	carne pesce gamberetti uova	urine dopo idrolisi	plasma siero	mangimi
spettrofotometro per micropiastre (450 nm)	•	•	•	•	•	•	•	•
pipette graduate	•	•	•	•	•	•	•	•
Micropipette a volume variabile (20-200 µl; 200-1000 µl)	•	•	•	•	•	•	•	•
mixer		•			•			•
shaker		•	•	•	•	•		•
centrifuga		•	•	•	•	•	•	•
evaporatore		•	•	•	•	•	•	•
vortex	•	•	•	•	•	•	•	•
incubatore						•		
bagno d'acqua		•						

5.2. Reagenti:

Reagenti	miele	pappa reale	carne pesce gamberetti	uova	urine dopo idrolisi	plasma siero	mangimi
acqua distillata	•		•				
etile acetato p.a.	•	•	•	•		•	•
n-esano ≥ 95%			•	•			•
<i>E. coli</i> β-Glucuronidase					•		
tampone potassio fosfato 75nM, pH 6.8					•		
NaOH 0.5 M		•					

Reagenti	yoghurt, kefir, latticello, panna	latte in polvere	cagliata, panna acida	burro	formaggio
PBS 20mM	•				
Carrez	•	•			
etile acetato p.a.	•	•	•		•
n-esano ≥ 95%		•		•	
Metanolo 20% (v/v)				•	
Metanolo 10% (v/v)			•	•	•

β-Glucuronidase da Escherichia coli (Sigma-Aldrich Art. No. G7646):

- Ricostituire la polvere liofilizzata in 1 mg/ml

tampone potassio fosfato 75nM, pH 6.8:

- Tampone A: 10.2 g KH_2PO_4 , portare a 1000 ml con acqua distillata
- Tampone B: 13.06 g K_2HPO_4 , portare a 1000 ml con acqua distillata
- Regolare il pH a 6.8 miscelando tampone A e B (rapporto 1:1)

0.5 M NaOH

–20 g NaOH, portare a 1000 ml con acqua distillata

PBS 20 mM:

- 0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8.77 g NaCl; portare a 1000 ml con acqua distillata; regolare il pH a 7.4 con NaOH

Carrez:

- Carrez I: 15.21 g ferrocianuro di potassio (II) x 3 H₂O; portare a 1000 ml con acqua distillata
- Carrez II: 29.90 g solfato di zinco x 7 H₂O; 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.

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 decade dopo la data di scadenza del kit indicata sulla confezione.

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a kit con numeri di lotti diversi.

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

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

9. Preparazione dei campioni

I campioni devono essere conservati in luogo fresco e protetti dalla luce.

9.1. Latte (crudo, fresco, pastorizzato, scremato, intero) vaccino e latte in polvere ricostituito secondo le istruzioni del produttore.

- Omogeneizzare un campione di latte rappresentativo vortexando brevemente
- Per il test utilizzare 50 µl di latte per ogni pozzetto

Per ottenere una migliore sensibilità per la rilevazione di cloramfenicolo nel latte in polvere seguire, in alternativa, la preparazione del campione (estrazione) descritta al paragrafo 9.2

9.2. Latte (scremato e intero): Estrazione

- sciogliere 1 g di latte in polvere in 10 ml di acqua distillata in una provetta per centrifuga da 50 ml e miscelare attentamente
- aggiungere 1 ml di Carrez I (vedi par. 5.2.) e vortexare
- aggiungere 1 ml di Carrez II (vedi par. 5.2.) e vortexare
- centrifugare: 10 min/ 3000 g/ 4-12°C
(se non si dispone di una centrifuga refrigerata, raffreddare il campione a ca. 8°C prima di procedere alla centrifugazione)
- trasferire 7.2 ml del surnatante in una nuova provetta per centrifuga da 50 ml
- aggiungere 6 ml di acetato di etile e shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 min/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 4 ml di surnatante di acetato di etile in una nuova provetta in vetro e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
Qualora rimangano residui di grassi dopo l'evaporazione: continuare come di seguito descritto *
- se non vi sono grassi, disciogliere il residuo secco in 400 µl di tampone di lavaggio (vedi paragrafo 10.1) ed agitare con vortex
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

* Qualora rimangano residui di grassi dopo l'evaporazione:

- aggiungere 400 µl di n-esano e vortexare
- aggiungere 400 µl di tampone di lavaggio e vortexare
- centrifugare: 10 min/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- utilizzare 50 µl della fase acquosa sottostante per ogni pozzetto

9.3. Prodotti lattiero-caseari

9.3.1 Yogurt, kefir, latticello, panna

- pesare 10 g di campione in una provetta per centrifuga
- aggiungere 8 ml di PBS 20 mM e miscelare
- aggiungere 1 ml di Carrez I (vedi par. 5.2.) e vortexare vigorosamente
- aggiungere 1 ml di Carrez II (vedi par. 5.2.) e shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 min/ 4000 g/ 4°C
- trasferire 4 ml del surnatante in una nuova provetta
- aggiungere 8 ml di acetato di etile e shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 min/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 4 ml di surnatante in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 500 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 10.1)
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.3.2 Cagliata, panna acida

- aggiungere 15 ml di metanolo al 10% a 5 g di campione e vortexare vigorosamente per 1 minuto
- centrifugare: 15 min/ 4000 g/ 4°C
- passare attraverso lo strato di crema e trasferire 4 ml di campione in una nuova provetta in vetro
- aggiungere 8 ml di acetato di etile
- shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 min/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 4 ml di surnatante in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 500 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 10.1)
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.3.3 Burro

- pesare 1 g di burro in una provetta per centrifuga da 10 ml
- lasciare sciogliere il burro a bagnomaria a circa 40°C
- aggiungere 1 ml di n-esano e vortexare vigorosamente per 10 s
- aggiungere 1 ml di metanolo al 20% e vortexare vigorosamente per 10 s

- shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 min/ 2000 g/ 4°C
- trasferire 700 µl della fase acquosa sottostante in una nuova provetta da 1.5 ml
- mettere la provetta in ghiaccio per 10 min
- centrifugare: 5 min/ 20.000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- diluire la fase acquosa sottostante 1:4.5 (1 + 3.5) con il tampone di lavaggio (vedi paragrafo 10.1) (ad esempio 200 µl della fase acquosa sottostante + 700 µl di tampone di lavaggio)
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.3.4 Formaggio

- rimuovere l'eventuale muffa nobile
- omogeneizzare 10 g di campione con 30 ml di metanolo al 30%
- incubare in un bagno d'acqua a circa 40°C per 10 min, shakerare vigorosamente per almeno 3 volte durante l'incubazione
- centrifugare: 15 min/ 4000 g/ 4°C
- trasferire 3.5 ml della fase acquosa sottostante in una nuova provetta per centrifuga ed aggiungere 7 ml di acetato di etile
- shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 min/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 3.5 ml di surnatante in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 500 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 10.1)
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.4. Miele

- disciogliere 2 g di miele in 4 ml di acqua distillata in una provetta per centrifuga
- aggiungere 4 ml di acetato di etile e agitare per circa 10 minuti capovolgendo la provetta
- centrifugare per separare per 10 minuti a 3000 g e a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- trasferire 1 ml di surnatante in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 500 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 10.1)
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.5. Pappa reale

- pesare 2 g di pappa reale in una provetta per centrifuga ed aggiungere 3 ml di NaOH 0.5 M
- shakerare fino a quando la pappa reale non è completamente disciolta
- aggiungere 8 ml di acetato di etile e vortexare vigorosamente per 1 minuto
- shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 2 ml di surnatante in una nuova provetta in vetro e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 500 µl di tampone di lavaggio
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.6 Carne (manzo, suino, pollame) pesce, gamberetti

- omogeneizzare una quantità rappresentativa di campione
- aggiungere 3 ml di acqua distillata e 6 ml di acetato di etile a 3 g di campione omogeneizzato e miscelare
- shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 4 ml di surnatante (corrispondenti a 2 g di campione) in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 1 ml di n-esano
- aggiungere 500 µl di tampone di lavaggio e vortexare per 1 minuto
- centrifugare: 10 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- utilizzare 50 µl della fase acquosa sottostante per ogni pozzetto

Il cloramfenicolo può essere estratto dai gamberetti anche insieme ad altri metaboliti (AHD, AMOZ, AOZ e SEM) di antibiotici nitrofurani in una singola preparazione del campione. L'estratto può essere utilizzato sia con il kit RIDASCREEN® Chloramphenicol sia con ciascun kit ELISA per Nitrofurani della linea RIDASCREEN®. In questo modo il tempo richiesto per l'analisi risulta notevolmente ridotto. Su richiesta è disponibili una nota applicativa dettagliata.

9.7. Uova (intere, albume, tuorlo) di gallina

- omogeneizzare una quantità rappresentativa di campione (
- aggiungere 8 ml di acetato di etile a 2 g di campione omogeneizzato
- shakerare per 10 min capovolgendo la provetta
- centrifugare: 10 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 4 ml di surnatante (corrispondenti a 1 g di campione) in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 1 ml di n-esano
- aggiungere 1000 µl di tampone di lavaggio e vortexare per 1 minuto
- centrifugare: 10 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- utilizzare 50 µl della fase acquosa sottostante per ogni pozzetto

9.8. Urine (bovine and porcine)

Dopo la somministrazione di cloramfenicolo ad animali da allevamento, il cloramfenicolo è metabolizzato nel fegato in associazione all'acido glucuronico. Il cloramfenicolo glucuronide risultante è escreto con le urine attraverso i reni. Per l'analisi di cloramfenicolo nelle urine, il campione deve essere idrolizzato prima dell'analisi. Qui, il cloramfenicolo glucuronide viene separato dall'enima glucuronidasi ed il cloramfenicolo rilasciato può essere analizzato. Dal momento che l'anticorpo utilizzato nel test mostra reattività crociata con il cloramfenicolo glucuronide nelle urine, è possibile determinare la concentrazione di cloramfenicolo glucuronide nelle urine mediante analisi diretta delle urine senza alcuna preparazione del campione. Per la valutazione dei risultati, si prega di consultare il paragrafo 11. Risultati

9.8.1 Uso diretto per l'analisi di cloramfenicolo glucuronide nelle urine

- miscelare bene il campione (tramite vortex)
- se le urine sono torbide, centrifugare: 10 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- utilizzare 50 µl di urine per ogni pozzetto
- se i risultati ottenuti sono superiori all'intervallo degli standard, i campioni di urina devono essere diluiti con il tampone di lavaggio

9.8.2 Idrolisi per l'analisi di cloramfenicolo nelle urine

- aggiungere 1 ml di tampone di fosfato di potassio 75mM, pH 6.8 e 10 µl di Escherichia coli β-Glucuronidase a 0.1 ml di urina in una provetta per centrifuga e miscelare
- idrolizzare per 3 ore a 37°C
- aggiungere 2 ml di acetato di etile e shakerare per 10 minuti capovolgendo la provetta
- centrifugare: 5 minuti/ 1000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 1000 µl di surnatante in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 500 µl di tampone di lavaggio e vortexare
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.9 Plasma/siero (bovino, suino)

- aggiungere 1 ml di acetato di etile a 500 µl di plasma/siero in una provetta di reazione da 2 ml
- vortexare per 1 min
- centrifugare: 5 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 700 µl di surnatante in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 350 µl di tampone di lavaggio e vortexare
- utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

9.9 Mangimi

- macinare completamente il campione
- aggiungere 4 ml di acetato di etile a 1 g di campione macinato in una provetta per centrifuga
- vortexare per 1 min
- centrifugare: 10 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- trasferire 2 ml di surnatante in una nuova provetta e ridurre a secco a 60°C sotto azoto o flusso d'aria.
- disciogliere il residuo secco in 1 ml di esano
- aggiungere 1000 µl di di tampone di lavaggio e vortexare per 1 minuto
- centrifugare: 10 minuti/ 3000 g/ temperatura ambiente (20-25°C)
- utilizzare 50 µl della fase acquosa sottostante per ogni pozzetto

10. Eseecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) prima dell'uso.

Come **soluzione di lavaggio** è necessario un tampone PBS Tween. Utilizzare la soluzione di lavaggio (sale) contenuta nel kit, indicata al capitolo 4. Disciogliere tutto il sale di lavaggio in un litro di acqua distillata. La soluzione così preparata è pronta all'uso e scade dopo circa 4-6 settimane se conservata a 2-8°C (35-46°F).

In alternativa: Disciogliere il contenuto della busta in soli 100 ml di acqua distillata per ottenere una soluzione di lavaggio concentrata 10x. Questa soluzione scade dopo circa 8-12 settimane e va conservata a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F). Utilizzare 1 parte di questa soluzione concentrata e discioglierla in 9 parti di acqua distillata per ottenere la soluzione di lavaggio pronta all'uso.

10.2. procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare il prosciugamento dei pozzetti tra un fase e l'altra del test.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto per tutti gli standard e i campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni assegnate agli standard ed ai campioni.
2. Aggiungere 50 µl di standard o campioni nei pozzetti in duplicato.
3. Aggiungere 50 µl di coniugato in ogni pozzetto, agitare leggermente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
4. Svuotare i pozzetti e picchiettare energicamente per tre volte la piastra su carta assorbente in modo da eliminare tutto il liquido dai pozzetti. Riempire i pozzetti con 250 µl di soluzione di lavaggio (vedi paragrafo 10.1) ed eliminare nuovamente il liquido ottenuto. Ripetere altre 2 volte.
5. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl della soluzione substrato/cromogeno. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) e al buio.
6. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le

assorbanze a 450 nm contro aria. Leggere entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

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:

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

Lo standard zero risulta pertanto essere il 100% e i valori di assorbanza sono quotati in percentuale. I valori calcolati per gli standard vanno inseriti in un sistema di coordinate su scala semilogaritmica contro la concentrazione equivalente di cloramfenicolo in ng/L.

Per ottenere la concentrazione di cloramfenicolo in ng/L / ng/kg (ppt) oppure µg/L / µg/kg (ppb) effettivamente contenuta nel campione, la concentrazione letta dalla curva standard deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione corrispondente. Operando secondo le procedure descritte, i fattori di diluizione sono:

latte	1
latte in polvere (ricostituito)	istruzioni del fornitore
latte in polvere (estrazione)	1
yogurt, kefir, latticello, panna	0.5
cagliata, panna acida.....	1
burro	5.2
formaggio	1
miele	1
pappa reale	1
carne, pesce, gamberetti	0.25
uova	1
urine, uso diretto.....	1
urine, dopo idrolisi	10
plasma/siero	1
mangimi.....	2

Analisi dei campioni di urine

I campioni di urina contengono quasi esclusivamente cloramfenicolo glucuronide. Il cloramfenicolo glucuronide può essere determinato mediante l'uso diretto di urina nel test. Il valore di concentrazione ottenuto deve essere corretto con la reattività crociata dell'anticorpo per il cloramfenicolo glucuronide nelle urine di bovino o suino.

Per il calcolo utilizzare la seguente formula:

$$\text{concentrazione di cloramfenicolo glucuronide} = \frac{\text{concentrazione}}{\text{cross-reattività}}$$

La concentrazione teorica di cloramfenicolo corrispondente alla concentrazione misurata di cloramfenicolo glucuronide può essere calcolata considerando il rapporto molare tra cloramfenicolo e acido glucuronico. Il rapporto molare è 0.65.

Per il calcolo utilizzare la seguente formula:

$$\begin{aligned} \text{concentrazione di cloramfenicolo glucuronide} \\ = \text{concentrazione di cloramfenicolo glucuronide} * 0.65 \end{aligned}$$

A causa della correzione per la cross-reattività ed il rapporto molare, il calcolo del valore di concentrazione del cloramfenicolo è impreciso. **Per determinare l'esatta concentrazione di cloramfenicolo nell'urina, è necessario eseguire l'idrolisi del campione di urina.**

Dopo aver tenuto conto del fattore di diluizione della preparazione del campione, il valore di concentrazione determinato dopo idrolisi rappresenta la concentrazione di cloramfenicolo nel campione di urina.

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.