



# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Suldonamide**

**Art. Nr. R3004**

Test immunoenzimatico per l'analisi  
quantitativa sulfamidici

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstraße 17  
D-642973 Darmstadt  
[www.r-biopharm.de](http://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](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

(0 61 51) 81 02-40  
[info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl  
Via Morandi 10  
20077 Melegnano MI  
Telefono 02 9823 3330  
[info@r-biopharm.it](mailto:info@r-biopharm.it) - [www.r-biopharm.com](http://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<sup>®</sup> Sulfonamide

## Introduzione

RIDASCREEN<sup>®</sup> Sulfonamide (Art.No. R3004) è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dei sulfamidici in campioni di uovo, carne (pollo e suino), pesce, gamberetti, miele e latte.

Tutti i reagenti richiesti per il saggio immunoenzimatico – standard compresi – sono contenuti nel kit.

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

Per la quantificazione è richiesto uno spettrofotometro per micropiastre.

Preparazione dei campioni: latte: utilizzo diretto previa diluizione 1:5  
carne (pollo e suino), uovo, pesce, gamberetti:  
omogeneizzazione, estrazione, centrifugazione,  
evaporazione e sgrassatura  
miele: estrazione, purificazione con colonne RIDA<sup>®</sup>  
C18 e diluizione

Tempo richiesto: preparazione di 10 campioni  
latte ..... ca. 10 min.  
carne (suino), uovo, pesce, gamberetti..... ca. 1 h 30'  
carne (pollo) ..... ca. 2 h 30'  
miele.....ca. 2 h  
esecuzione del testo (incubazione).....1 h 15'

Limite di rilevabilità:  
(corrispondente alla sostanza  
standard)  
carne (pollo), uovo.....1.5 µg/kg (ppb)  
carne (suino), pesce  
gamberetti, miele... ..... 2 µg/kg (ppb)  
latte ..... 3.5 µg/kg (ppb)

Valori di recupero:  
(corrispondente alla sostanza  
standard)  
uovo .....ca. 88 %  
carne di pollo .....ca. 70 %  
carne suina.....ca. 115 %  
pesce.....ca.120 %  
gamberetti.....ca. 88 %  
miele..... ca. 89 %  
latte .....ca. 101 %

La specificità di RIDASCREEN® Sulfonamide 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.

Sulfametossipiridazina.....	ca. 100 %
Sulfapiridina.....	> 100 %
Sulfametossidiazina.....	ca. 75 %
Sulfametossazolo .....	ca. 58 %
Sulfadimetossina .....	ca. 41 %
Sulfachinossalina.....	ca. 34 %
Sulfaclopiridazina .....	ca. 19 %
Sulfamerazina.....	ca. 18 %
Sulfadiazina .....	ca. 15 %
Sulfametizolo .....	ca. 14 %
Sulfadossina.....	ca. 10 %
Sulfaclopirazina. ....	ca. 9 %
Sulfaguanidina.....	5 %
Sulfafenazolo, Sulfametazina, Sulfisossazolo, Sulfanilamide .....	2 %
Sulfacetamide.....	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](http://www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis)

#### **Prodotti correlati:**

RIDASCREEN® Sulfamethazin .....	(R3001)
RIDA® Sulfamethazin Spiking Solution .....	(R3098)
RIDA® Sulfonamide Sulfamethoxyypyridazin Spiking Solution .....	(R3099)

## **1. Scopo**

RIDASCREEN<sup>®</sup> Sulfonamide è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa dei sulfamidici in campioni di uovo, carne di pollo e suina, pesce, gamberetti, miele e latte.

## **2. Generale**

I sulfamidici sono largamente impiegati come additivi alimentari, principalmente per l'ingrassamento di vitelli e suini. In combinazione con gli inibitori della diidrofolato reductasi (trimetoprim, tetrossoprim, pirimetamina), i sulfamidici trovano impiego anche nella pratica veterinaria per il trattamento di infezioni intestinali, mastiti, polmoniti e altre malattie sistemiche. Pertanto è possibile reperire residui di sulfamidici in alimenti di origine animale come le carni e il latte, specialmente se provenienti da paesi esteri. La legislazione UE stabilisce un limite massimo di residui per tutte le sostanze appartenenti al gruppo dei sulfamidici pari a 100 µg/kg per campioni di tessuto muscolare, adiposo, epatico e renale e di 100 µg/kg nel latte.

## **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-sulfamidici. Ad essi vengono aggiunti gli standard oppure la soluzione campione, il sulfamidico coniugato all'enzima e gli anticorpi anti-sulfamidici. I sulfamidici liberi e i sulfamidici coniugati all'enzima competono per i siti di legame anticorpali (saggio immunoenzimatico competitivo). Contemporaneamente, gli anticorpi anti-sulfamidici si legano anche agli anticorpi di cattura immobilizzati. L'enzima coniugato non legato viene quindi eliminato con un lavaggio. Nei pozzetti viene aggiunta e incubata la soluzione substrato/cromogeno. L'enzima coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop determina il viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione è eseguita fotometricamente a 450 nm. L'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di sulfamidici nel campione.

## 4. Reagenti forniti

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

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
<b>Micropiastra</b>	-	Pronto all'uso		96 pozzetti
<b>Standard 1</b>	Bianco	Pronto all'uso	0 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 2</b>	Bianco	Pronto all'uso	1 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 3</b>	Bianco	Pronto all'uso	3 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 4</b>	Bianco	Pronto all'uso	10 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 5</b>	Bianco	Pronto all'uso	30 µg/l	1.3 ml
<b>Standard 6</b>	Bianco	Pronto all'uso	100 µg/l	1.3 ml
<b>Wash buffer salt Tween</b>	-	Sali da sciogliere		
<b>Conjugate</b>	Rosso	Pronto all'uso		6 ml
<b>Antibody</b>	Nero	Pronto all'uso		6 ml
<b>Sample buffer</b>	Bianco	Pronto all'uso		110 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
<b>Stop solution</b>	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

## 5. Materiale richiesto ma non fornito

### 5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- centrifuga
- agitatore (Vortex)
- miscelatore (Stomacher, Ultraturrax)
- evaporatore rotante
- pipette pasteur
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20 µl - 200 µl e 200 - 1000 µl

### 5.2. Reagenti:

- metanolo p.a.
- etilacetato
- acetonitrile
- n-esano (o n-eptano)
- NaCl

- Tampone di sodio acetato 50 mM: disciogliere 4.1 g di acetato di sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) in 900 ml di acqua distillata, regolare a pH 5 con HCl e 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](http://www.r-biopharm.com)

## 7. Conservazione

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

Richiudere i pozzetti non utilizzati nella busta originale di alluminio insieme all'essiccante fornito e conservarli a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

La soluzione substrato/cromogeno di colore rossastro è fotosensibile, evitare di esporla a luce diretta.

La garanzia di qualità decade alla data di scadenza indicata in etichetta.

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a kit con numero di lotto diverso.

## 8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno prima dell'esecuzione del test
- un valore inferiore a 0.6 unità di assorbanza ( $A_{450\text{ nm}} < 0.6$ ) per lo standard 1

## 9. Preparazione dei campioni

- conservare i campioni in luogo fresco, al riparo dalla luce
- omogeneizzare il campione utilizzando uno stomacher o un miscelatore

### 9.1. Campioni di latte

- diluire i campioni di latte 1:5 (1+4) con il tampone di diluizione dei campioni (vedi 4.); ad es. 100 µl di latte + 400 µl di tampone di diluizione dei campioni
- utilizzarne 50 µl per pozzetto nel test

### 9.2. Campioni di carne (suina), uovo, pesce e gamberetti

- introdurre 1 g di campione omogeneizzato in una provetta per centrifuga con tappo a vite, aggiungere 2 ml di metanolo e vortexare per 30 secondi
- centrifugare per 10 minuti a 4000 g e a 20 - 25 °C (68 - 77 °F)
- trasferire 1.5 ml della soluzione metanolica in un'altra fiala per centrifuga ed evaporare a secco
- disciogliere il residuo in 0.5 ml di tampone di diluizione dei campioni, aggiungere 1 ml di n-esano (o di n-eptano) per separare il grasso e vortexare per 10 sec.
- centrifugare per 10 minuti a 4000 g e a 20 - 25 °C (68 - 77 °F)
- nel test utilizzare 50 µl della fase inferiore per ogni pozzetto

### 9.3. Campioni di carne (pollo)

- introdurre 2 g di campione omogeneizzato in unaprovetta per centrifuga con tappo a vite, aggiungere 6 ml di soluzione di acetonitrile e acqua (84:16 v:v) e agitare per 10 minuti per inversione
- centrifugare per 10 minuti a 3000 g e a 15 °C (59 °F)
- trasferire 4 ml di surnatante in un'altra fiala per centrifuga, aggiungere 2 ml di NaCl 2 M, 7 ml di etil acetato e agitare per 10 minuti per inversione
- centrifugare per 10 minuti a 3000 g e a 15 °C (59 °F)
- trasferire tutto il surnatante in una nuova fiala per centrifuga ed evaporare a secco
- disciogliere il residuo in 1 ml di diluente del campione, vortexare per 1 minuto, aggiungere 1 ml di n-esano (o di n-eptano) e vortexare nuovamente per 2 minuti
- centrifugare per 10 minuti a 3000 g e a 15°C (59 °F)
- nel test utilizzare 50 µl della fase inferiore per ogni pozzetto

## 9.4. Campioni di miele

- introdurre 3 g di miele in una provetta per centrifuga con tappo a vite e miscelare per l'estrazione con 6 ml di tampone di sodio acetato 50 mM a pH 5 (vedi 5.2.)
- vortexare fino a completo scioglimento del campione di miele
- centrifugare per 10 minuti a 4000 g e a 20 - 25 °C (68 - 77 °F)

Purificare l'intero estratto in una colonna RIDA<sup>®</sup> C18 (Cod. R2002); flusso: 1 goccia/secondo:

- sciacquare la colonna con 2 ml di metanolo
- equilibrare la colonna con 2 ml di tampone di sodio acetato 50 mM (pH 5)
- applicare l'intero volume di estratto del campione
- risciacquare la colonna con 8 ml di tampone di acetato di sodio 50 mM (pH 5)
- eliminare il liquido in eccesso applicando una pressione e sciacquare la cartuccia con un flusso di aria o di azoto per 2 minuti
- eluire lentamente il campione con 1 ml di una soluzione 20:80 v/v di metanolo/diluyente del campione
- diluire l'eluato 1:3 (1+2) col diluyente del campione (es. 100 µl di eluato + 200 µl di diluyente del campione)
- nel saggio utilizzare 50 µl per ogni pozzetto

## 10. Esecuzione del test

### 10.1. Commenti preliminari

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

Come **diluyente di lavaggio** è necessario un tampone PBS-Tween; utilizzare a tal fine il sale di tampone di lavaggio contenuto nella busta inclusa nel kit (vedi 4.). Disciogliere l'intero contenuto della busta in un litro di acqua distillata. Il tampone pronto all'uso scade dopo ca. 4 - 6 settimane se conservato a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

In alternativa: Disciogliere il contenuto della busta in 100 ml di acqua distillata per ottenere un tampone di lavaggio concentrato 10 volte. Questa soluzione scade dopo ca. 8 - 12 settimane se conservata a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Utilizzare una parte di questo concentrato e scioglierla in 9 parti di acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso.

## 10.2. Procedura del test

Eseguire scrupolosamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare il prosciugamento dei pozzetti tra un passaggio e l'altro del test.

1. Inserire negli appositi supporti della micropiastra un numero sufficiente di pozzetti per tutti gli standard e i campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni di standard e campioni.
2. Aggiungere nei rispettivi pozzetti 50 µl di soluzione standard o di campione preparato, utilizzando un nuovo puntale per pipetta per ciascuno standard o campione.
3. Aggiungere sul fondo di ciascun pozzetto 50 µl di soluzione di coniugato
4. Aggiungere in ogni pozzetto 50 µl di soluzione anticorpale, miscelare delicatamente facendo oscillare la micropiastra manualmente e incubare per 1 h a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Svuotare il liquido dai pozzetti e picchiettare energicamente la piastra su un foglio di carta assorbente in modo da eliminare tutto il liquido. Ripetere l'operazione per tre volte. Riempire i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) ed eliminare nuovamente il liquido. Ripetere l'intera procedura altre 2 volte.
6. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione substrato/cromogeno (tappo marrone). Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) e al buio.
7. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di stop. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e misurare l'assorbanza a 450 nm. Leggere i risultati entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

## 11. Risultati

Per la valutazione delle analisi eseguite con i kit RIDASCREEN® ELISA è possibile utilizzare un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win.net (cod. Z9996).

Il profilo della curva standard è riportata nel Certificato di Assicurazione di Qualità allegato.

Nota per il calcolo eseguito senza l'utilizzo dell'apposito software:

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

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 di sulfamidici espressa in µg/kg.

Per ottenere la concentrazione di sulfamidici in µg/kg (ppb) effettivamente contenuta nel campione, la concentrazione calcolata dalla curva standard deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione corrispondente. Operando secondo le procedure descritte, i fattori di diluizione da applicare sono i seguenti:

Latte .....	5
Carne suina, uovo, pesce, gamberetti.....	1
Carne di pollo .....	1
Miele.....	1

**Per ulteriori informazioni o note applicative si prega di contattare il proprio distributore locale.**

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.