



RIDASCREEN[®] Tetracyclin

Art. Nr. R3505

Test immunoenzimatico per l'analisi
quantitativa di Tetraciclina

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® Tetracyclin

Introduzione

RIDASCREEN® Tetracyclin (Art. No.: R3505) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di tetracicline in latte, latte in polvere, formaggio, burro, latticini (ricotta, yogurt (con e senza frutta), kefir, panna, panna acida) miele, carne, salumi, pesce, gamberetti e uovo intero.

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, miele: diluizione
latte in polvere: ricostituzione, diluizione
formaggio: omogeneizzazione ed estrazione
burro: fusione, estrazione, sgrassatura, diluizione
latticini: incubazione, centrifugazione, diluizione
mele: dissoluzione
carne, salumi, pesce, gamberetti, uovo intero:
omogeneizzazione ed estrazione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (per 10 campioni)
latte:..... ca. 30 min
latte in polvere: ca. 45 min
formaggio: ca. 90 min
burro: ca. 60 min
latticini: ca. 40 min
miele: ca. 30 min
carne: ca. 45 min
salumi ca. 40 min
pesce, gamberetti: ca. 30 min
uovo intero ca. 50 min
esecuzione del test (incubazione) 1 h 30 min

Limite di rilevabilità:

(corrispondente alla sostanza standard)

latte	ca. 0.9 µg/l
latte in polvere:	ca. 5 µg/kg
formaggio:	ca. 2.3 µg/kg
burro:	ca. 2.6 µg/kg
latticini:	ca. 1 µg/kg
miele:	ca. 3.7 µg/kg
carne:	ca. 1.5 µg/kg
salumi:	ca. 4.6 µg/kg
pesce:	ca. 1.5 µg/kg
gamberetti:	ca. 1.2 µg/kg
uovo intero:	ca. 2.8 µg/kg

Valori di recupero:

(corrispondente alla sostanza standard)

latte	ca. 111 %
latte in polvere	ca. 102 %
formaggio	ca. 107 %
burro.....	ca. 87 %
latticini	ca. 94-114%
miele	ca. 97 %
carne	ca. 99 %
salumi.....	ca. 97%
pesce	ca. 113%
gamberetti	ca. 97 %
uovo intero	ca. 76%

La specificità di RIDASCREEN® Tetracyclin 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:

Tetraciclina (soluzione standard).....	100 %
Clortetraciclina	ca. 70 %
Rolitetraciclina.....	ca. 34 %
Demeclociclina	ca. 26%
Ossitetraciclina	ca. 13%
Minociclina	ca. 3%
Dossiciclina	ca. 2%

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[®] Tetracyclin Spiking Solution..... (R3599)

1. Scopo

RIDASCREEN[®] Tetracyclin è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di tetracicline in latte, latte in polvere, formaggio, burro, latticini (ricotta, yogurt (con e senza frutta), kefir, panna, panna acida) miele, carne, salumi, pesce, gamberetti e uovo intero.

2. Generale

Nel 1948 l'aureomicina (clortetraciclina) fu isolata da Duggan come metabolita di una specie di actinomiceti – *streptomyces aureofaciens*. Essa fu la prima sostanza antibiotica isolata facente parte del gruppo delle tetracicline. In Germania la tetraciclina, la clortetraciclina e l'ossitetraciclina sono autorizzate nella pratica veterinaria. Pertanto il loro uso può comportare rischi per la salute del consumatore.

La presenza di residui di tetracicline (somma del composto madre e dei 4 epimeri) negli animali utilizzati per l'alimentazione umana è governata, nell'ambito della Comunità Europea, dal Regolamento No.37/2010 che stabilisce i seguenti limiti: 100 µg/kg nel muscolo e nel latte.

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con tetraciclina coniugata con proteina. Vi si aggiungono: standard di tetraciclina o soluzioni campione e anticorpi anti-tetraciclina. La tetraciclina libera e quella immobilizzata competono per i siti di legame anticorpali (saggio immunoenzimatico competitivo). Dopo il lavaggio, in cui viene eliminato tutto l'anticorpo non legato, viene aggiunto un anticorpo secondario coniugato con enzima diretto contro gli anticorpi anti-tetraciclina. L'enzima coniugato non legato

viene rimosso con il lavaggio. Successivamente viene aggiunta la soluzione di substrato/cromogeno e i pozzetti vengono incubati. L'enzima coniugato legato converte il cromogeno incolore in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di 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 della tetraciclina 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 1	Bianco	Pronto all'uso		60 ml
Sample buffer 2	Marrone	Pronto all'uso		60 ml
Standard 1	Bianco	Concentrato	0 µg/l	1.3 ml
Standard 2	Bianco	Concentrato	0.5 µg/l	1.3 ml
Standard 3	Bianco	Concentrato	1.5 µg/l	1.3 ml
Standard 4	Bianco	Concentrato	3 µg/l	1.3 ml
Standard 5	Bianco	Concentrato	6 µg/l	1.3 ml
Standard 6	Bianco	Concentrato	18 µg/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween		Sali da sciogliere		
Conjugate	Rosso	Pronto all'uso		10 ml
Antibody	Nero	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:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- centrifuga
- vortex
- shaker
- bagno d'acqua (per latticini)
- bagno ad ultrasuoni (opzionale per latte in polvere e miele)
- mixer (Stomacher, Ultra turrax; per carne, pesce, gamberetti e salumi)
- pipette pasteur
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20-200 e 200-1000 μ l

5.2. Reagenti:

campioni di miele, carne, salumi, pesce e gamberetti:

- tampone PBS 20 mM: 0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 9 g NaCl, regolare il pH a 7.4 con NaOH, portare a 1000 ml con acqua distillata

campioni di latte in polvere:

- acqua distillata

campioni di formaggio:

- matanolo al 10% (v/v)

campioni di carne e burro:

- n-esano

campioni di uovo intero

tampone di acido succinico 50 mM: sciogliere 5.9 g di acido succinico in 500 ml di acqua distillata, regolare il pH a 4.0 con NaOH 1N, 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 (36-46°F). Non congelare alcun componente del kit.

I pozzetti non utilizzati vanno tenuti con l'agente essiccante nel sacchetto ben chiuso con la zip e conservati a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno è fotosensibile, di conseguenza evitarne l'esposizione alla luce diretta.

La garanzia di qualità del prodotto decade alla data di scadenza riportata sulla confezione.

Non scambiare i reagenti di kit con numero di lotto diverso.

8. Indicazioni di instabilità e deterioramento

- Qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno prima dell'esecuzione del saggio
- Valori inferiori a 0,6 unità di assorbanza ($A_{450\text{nm}} < 0,6$) per lo standard 1

9. Preparazione dei campioni

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

9.1. Latte

Latte con un contenuto di grassi > 1.5%:

- centrifugare i campioni di latte intero: 10 minuti / 3000 g / 10°C (50°F)
(se non si ha a disposizione una centrifuga refrigerata, prima di procedere, raffreddare i campioni a 10°C / 50°F)
- asportare completamente lo strato cremoso in superficie (ad esempio con una pipetta pasteur) e diluire il latte scremato così ottenuto 1:10 (1+9) con il tampone (ad esempio 50 µl di latte + 450 µl di tampone)
- nel saggio applicare 50 µl per pozzetto

Latte con un contenuto di grassi < 1.5%:

- diluire i campioni di latte scremato 1:10 (1+9) con il tampone 2
(ad esempio 50 µl di latte + 450 µl di tampone 2)
- nel saggio applicare 50 µl per pozzetto

9.2. Latte in polvere

- pesare 10 g di latte in polvere e aggiungere acqua distillata pre-riscaldata (60°C/140 °F) fino ad ottenere un volume finale di 100 ml
- agitare/mescolare per rotazione per 10 minuti o più a lungo, se necessario, fino a quando il latte in polvere non si è sciolto completamente (omogenizzare la polvere di latte che non si è sciolta facilmente per 3 minuti in un bagno ad ultrasuoni)
- centrifugare: 10 min/ 3500 g/ 10°C (50°F)
- asportare completamente lo strato cremoso in superficie (ad esempio con una pipetta pasteur) e diluire il latte scremato così ottenuto 1:10 (1+9) con il tampone in una nuova provetta (ad esempio 50 µl di latte + 450 µl di tampone)
- nel saggio applicare 50 µl per pozzetto.

9.3. Formaggio

- aggiungere 20 ml di metanolo al 10% (v/v) a 5 g di formaggio
- omogeneizzare il campione (utilizzando stomacher, miscelatore o ultra-turrax)
- trasferire il campione omogeneizzato in una provetta per centrifuga da 50 ml
- mescolare per inversione per 10 min
- centrifugare: 15 min/ 3000 g/ 4°C (39.2°F)
- trasferire 1 ml della soluzione acquosa (metà) in una provetta da 1.5 ml
- centrifugare 5 min/ 20.000 g/ temperatura ambiente (20 – 25 °C/ 68 – 77 °F)
- diluire il surnatante 1:5 (1+4) con il tampone 2
(ad esempio 100 µl di surtante + 400 µl di tampone 2)
- nel saggio applicare 50 µl per pozzetto.

9.4. Burro

- pesare 1 g di burro in una provetta per centrifuga da 10 ml
- sciogliere il burro in un bagno termostato a ca. 40°C (104°F)
- aggiungere 1 ml di n-esano e mescolare vigorosamente per 1 min con vortex
- aggiungere 1 ml di metanolo al 20% (v/v)
- mescolare vigorosamente per 10 s tramite vortex
- agitare la provetta per rotazione per 10 min
- centrifugare: 10 min/ 2.000 g/ 4°C (39.2°F)
- rimuovere lo strato superficiale di esano tramite una pipetta pasteur
- aggiungere 1 ml di n-esano e mescolare vigorosamente per 1 min con vortex
- centrifugare: 10 min/ 2.000 g/ 4°C (39.2°F)
- trasferire 1 ml dello strato sottostante acquoso in una provetta da 1.5 ml e mettere la provetta in ghiaccio
- centrifugare: 10 min/ 20.000 g/ 20-25°C (68-77°F)
- diluire una aliquota della fase sottostante acquosa 1:17 (1+16) con il tampone 1
(ad esempio 50 µl di campione + 800 µl di tampone 1)
- nel saggio applicare 50 µl per pozzetto.

9.5. Latticini (ricotta, yogurt (con e senza frutta), kefir, panna, panna acida)

- trasferire 5 g di campione in una provetta per centrifuga
- incubare il campione per 15 min a 50°C (122°F) ad esempio in una bagnetto termostato
- miscelare tramite vortex fino ad omogeneizzare completamente il campione
- centrifugare: 10 min/4000 g/ 10°C (50°F)
- diluire il surnatante 1:10 (1+9) con il tampone 2
(ad esempio 50 µl di surnatante + 450 µl di tampone 2)
- nel saggio applicare 50 µl per pozzetto.

9.6 Miele

- pesare 1 g di miele in un flacone di vetro con tappo a vite (80 ml)
- diluire 1:50 (1+49) con tampone PBS 20 mM, pH 7.4 (vedi par. 5.2.)
(ad esempio 1 g di miele + 50 ml di tampone PBS 20 mM, pH 7.4)
Opzionale, per i campioni di miele che si sciolgono con difficoltà: incubare per 5 min in un bagno ad ultrasuoni
- agitare energicamente per 2 minuti (vortex)
- prima di utilizzare la soluzione nel test agitare brevemente il flacone in verticale
- nel saggio applicare 50 µl per pozzetto

9.7. Carne (bovino, suino, pollame)

- omogeneizzare la carne (con stomacher, mixer o ultraturrax)
- trasferire 1 g di carne omogeneizzata in una provetta per centrifuga e aggiungere 9 ml di tampone PBS 20 mM, pH 7.4 (vedi.5.2.)
- mescolare tramite vortex il campione e il tampone
- agitare 10 minuti per l'estrazione
- centrifugare:10 minuti /4000 g/ temperatura ambiente (20-25°C/ 68 -77°F)
- trasferire 1 ml di surnatante in una nuova provetta
- aggiungere 2 ml di esano
- mescolare tramite vortex per 10 s
- centrifugare:10 minuti /4000 g/ temperatura ambiente (20-25°C/ 68 -77°F)
- nel saggio applicare 50 µl della soluzione acquosa sottostante per pozzetto

9.8. Salumi (salame, prosciutto, mortadella)

- omogeneizzare 3 g di campione e 30 ml di tampone PBS 20 mM, pH 7.4 (con stomacher, mixer o ultraturrax)
- trasferire il campione in una provetta per centrifuga
- centrifugare:10 minuti /4000 g/ 10 °C (50°F)
- diluire il surnatante 1:2 (1+1) con il tampone 1 (ad esempio 500 µl di surnatante + 500 µl di tampone 1)
- nel saggio applicare 50 µl

9.9. Pesce e Gamberetti

- omogeneizzare il campione (con stomacher, mixer o ultraturrax)
- trasferire 1 g di campione omogeneizzato in una provetta per centrifuga con tappo a vite e aggiungere 9 ml di tampone PBS 20 mM, pH 7.4 (vedi.5.2.)
- miscelare tramite vortex il campione ed il tampone
- agitare/mescolare mediante rotazione il campione per 10 minuti per l'estrazione
- centrifugare:10 minuti /4000 g/ temperatura ambiente (20-25°C/ 68 -77°F)
- nel saggio applicare 50 µl della soluzione acquosa sottostante per pozzetto

9.10. Uovo intero in polvere

- omogeneizzare a fondo il tuorlo e l' albume di un uovo
- trasferire 4 g di campione in una provetta in polipropilene ed aggiungere 20 ml di tampone di acido succinico 50 mM
- mescolare 15 min, temperatura ambiente (20 - 25 ° C / 68 - 77 ° F) per agitazione / rotazione
- centrifugare: 15 min / 4.000 g / temperatura ambiente (20 - 25 ° C / 68 - 77 ° F)
- diluire il surnatante 1:10 (1 + 9) con tampone PBS 20 mM, pH 7.4 (ad esempio 100 µl di surnatante + 900 µl di tampone PBS 20 mM, pH 7.4)
- Usare 50 µl per pozzetto nel saggio

10. Esecuzione

10.1. Indicazioni preliminari

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

Gli **standard** sono forniti concentrati. Per prepararli pronti all'uso, diluire 50 µl di ciascuno standard concentrato con 450 µl di **tampone** e agitare bene. Utilizzare provette di vetro.

Per burro, miele, carne, salumi, pesce, gamberetti e uovo intero utilizzare il **tampone 1** per la diluizione delle soluzioni concentrate.

Per latte, latte in polvere, formaggi e latticini, utilizzare il **tampone 2** per per la diluizione delle soluzioni concentrate

Standard 1: 50 µl standard concentrato	(0 µg/l) + 450 µl tampone	0 µg/l
Standard 2: 50 µl standard concentrato	(0.5 µg/l) + 450 µl tampone	0.05 µg/l
Standard 3: 50 µl standard concentrato	(1.5 µg/l) + 450 µl tampone	0.15 µg/l
Standard 4: 50 µl standard concentrato	(3 µg/l) + 450 µl tampone	0.3 µg/l
Standard 5: 50 µl standard concentrato	(6 µg/l) + 450 µl tampone	0.6 µg/l
Standard 6: 50 µl standard concentrato	(18 µg/l) + 450 µl tampone	1.8 µg/l

Gli standard devono essere preparati al momento dell'esecuzione del test.

Come **soluzione lavaggio** è necessario un diluente PBS-Tween, si prega di utilizzare il tampone di lavaggio (sale) contenuto nel kit (vedi paragrafo 4.). Sciogliere il contenuto totale della busta in un litro di acqua distillata. Il tampone di lavaggio pronto all'uso scade dopo circa 4 - 6 settimane a 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

In alternativa: Sciogliere il contenuto della busta in 100 ml di acqua distillata per ottenere una soluzione di lavaggio concentrata 10 volte. Questa soluzione scade dopo ca. 8 - 12 settimane, conservata a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Utilizzare una parte di questa soluzione concentrata e diluirla con 9 parti di acqua distillata per ottenere una soluzione di lavaggio pronta all'uso.

10.2. Procedura

Eseguire scrupolosamente la procedura di lavaggio consigliata, evitando il prosciugamento dei pozzetti tra una fase e l'altra.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto per tutti gli standard e campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni assegnate agli standard ed ai campioni.
2. Pipettare 50 µl di standard o campioni preparati nei pozzetti corrispondenti in doppio.
3. Pipettare 50 µl di anticorpo anti-tetraciclina in ogni pozzetto. Agitare leggermente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 1 ora a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
4. Svotare 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 tampone di lavaggio (vedi par. 10.1.) ed eliminare nuovamente il liquido ottenuto. Ripetere altre 2 volte.
5. In ogni pozzetto pipettare 100 µl di enzima coniugato. Agitare leggermente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
6. Svotare 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 tampone di lavaggio (vedi par. 10.1.) ed eliminare nuovamente il liquido ottenuto. Ripetere altre 2 volte.
7. Aggiungere 100 µl della soluzione substrato/cromogeno (tappo marrone) in ogni pozzetto. Agitare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
8. Pipettare 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Agitare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm, entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

E' disponibile uno speciale software, RIDA[®]SOFT Win/ RIDA[®]SOFT Win.net (Art. No. Z9996), per l'elaborazione dei kit ELISA RIDASCREEN[®].

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

Nota per il calcolo in assenza di 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 percentuali. I valori calcolati per gli standard vanno inseriti in un sistema di coordinate su scala semilogaritmica contro la concentrazione equivalente di tetraciclina in µg/l.

Per ottenere la concentrazione di tetraciclina in µg/l oppure µg/kg 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 per la tetraciclina e la clortetraciclina sono i seguenti:

latte, latticini, carne, gamberetti, pesce	10
latte in polvere	100
formaggio.....	25
burro, salumi.....	20
miele.....	50
uovo intero.....	60

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.