



RIDASCREEN® Nitrofuran (AHD)

Art. Nr. R3713

Test immunoenzimatico per l'analisi
quantitativa di AHD

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® Nitrofuran (AHD)

Introduzione

RIDASCREEN® Nitrofuran (AHD) (Art. No.: R3713) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di AHD in gamberetti e pesce.

Tutti i reagenti richiesti per il dosaggio - inclusi 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: omogeneizzazione, derivatizzazione, estrazione, centrifugazione, evaporazione e sgrassatura

Tempo richiesto:	preparazione di 10 campioni
	preparazione campioni parte 1 ca. 1.5 h
	incubazione 3 h
	preparazione campioni parte 2 ca. 1.5 h
	esecuzione del test (tempo d'incubazione) 1 h 15 min

Limite di rilevabilità: (corrispondente alla sostanza standard)	gamberetti ca. 200 ng/kg (ppt)
	pesce ca. 76 ng/kg (ppt)

Valori di recupero: (corrispondente alla sostanza standard)	gamberetti ca. 94 %
	pesce ca. 82 %

La specificità di RIDASCREEN® Nitrofuran (AHD) 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:	Nitrophenyl- (NP) AHd	100 %
	NP-AMOZ, NP-AOZ, NP-SEM	< 1 %
	Nitrofurantoine	ca 32 %
	Furaltadone, Furazolidone, Nitrofurazone	< 2 %
	AHD, AMOZ, AOZ, SEM	< 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:

RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ)	(R3703)
RIDASCREEN® Nitrofuran (AMOZ)	(R3711)
RIDASCREEN® Nitrofuran (SEM)	(R3715)
RIDASCREEN® Chloramphenicol	(R1505)
RIDA® Nitrofuran (AMOZ) Spiking solution	(R3799)
RIDA® Nitrofuran (AOZ) Spiking solution	(R3798)
RIDA® Nitrofuran (AHD) Spiking solution	(R3796)
RIDA® Nitrofuran (SEM) Spiking solution	(R3797)
RIDA® Chloramphenicol Dotierlösung.....	(R1599)

1. Scopo

RIDASCREEN® Nitrofuran (AHD) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di AHD in gamberetti e pesce.

2. Generale

I nitrofurani sono antibiotici sintetici a largo spettro che vengono frequentemente impiegati nella produzione animale per le loro eccellenti proprietà antibatteriche e farmacocinetiche. In passato sono stati anche utilizzati come promotori di crescita nell'allevamento di suini, polli e pesce. Studi a lungo termine su animali da esperimento hanno evidenziato le proprietà cancerogene e mutagene dei composti originari e dei loro metaboliti. Ciò ha portato a vietare l'impiego dei nitrofurani nel trattamento degli animali destinati alla produzione alimentare: a tal fine farmaci quali il furaltadone, la nitrofurantoine e il nitrofurazone, appartenenti ai nitrofurani, sono stati banditi dalla UE nel 1993, mentre l'utilizzo del furazolidone è stato proibito nel 1995.

Le analisi di residui di farmaci a base di nitrofurani si basa sull'individuazione dei metaboliti dei composti originari nitrofuranici che si fissano nei tessuti. I composti originali sono difficili da rilevare accuratamente perché sono metabolizzati rapidamente dopo il trattamento. I metaboliti nitrofuranici nei tessuti sono invece rilevabili anche a lunga distanza dalla somministrazione del farmaco e vengono quindi impiegati come indicatori di un uso illecito di nitrofurani.

Prima dell'analisi, i metaboliti devono essere derivatizzati mediante incubazione con 2-nitrobenzaldeide in NP-AHD, NP-AMOZ, NP-AOZ e NP-SEM.

composti originari	metaboliti		Dopo derivatizzazione
Nitrofurantoina	1-amminoidantoina	AHD	NP-AHD
Furaltadone	3-ammino-5-morfolinometil-2-oxazolidinone	AMOZ	NP-AMOZ
Furazolidone	3-ammino-2-oxazolidinone	AOZ	NP-AOZ
Nitrofurazone	semicarbazide	SEM	NP-SEM

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 anticorpi anti-AHD. Vengono aggiunti: soluzioni standard o campioni di AHD, AHD coniugato con enzima e anticorpi anti-AHD. AHD e AHD coniugato con l'enzima competono per i siti di legame degli anticorpi anti-AHD (immunodosaggio enzimatico competitivo). Contemporaneamente gli anticorpi anti-AHD vengono legati dagli anticorpi di cattura immobilizzati. L'enzima coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Viene aggiunta la soluzione substrato/cromogeno ai pozzetti ed eseguita la fase di incubazione. L'enzima coniugato legato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'addizione della soluzione di stop determina il viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm. L'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di AHD 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
2-Nitrobenzaldehyde	-	solido		100 mg
Standard 1	Bianco	Pronto all'uso	0 ng/l	1.3 ml
Standard 2	Bianco	Pronto all'uso	100 ng/l	1.3 ml
Standard 3	Bianco	Pronto all'uso	300 ng/l	1.3 ml
Standard 4	Bianco	Pronto all'uso	900 ng/l	1.3 ml
Standard 5	Bianco	Pronto all'uso	2700 ng/l	1.3 ml
Standard 6	Bianco	Pronto all'uso	8100 ng/l	1.3 ml
Wash buffer salt Tween	-	Sali da sciogliere		
Conjugate	Rosso	Concentrato	11 x	0.7 ml
Antibody	Nero	Concentrato	11 x	0.7 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
- agitatore (Vortex)
- miscelatore (stomacher, ultraturrax)
- evaporatore rotante
- agitatore magnetico
- pipette pasteur
- pipette graduate
- micropipette da 20–200 µl e 200-1000 µl, a volume variabile

5.2. Reagenti:

- HCl 1M
- NaOH 1M
- K₂HPO₄ 0.1 M
- acetato di etile
- n-esano
- dimetilsolfossido (DMSO)

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'essiccatore 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 deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno, normalmente di colore rosso, prima dell'esecuzione del test
- Valori inferiori 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 ed al riparo dalla luce
- omogeneizzare il campione, utilizzando stomacher o mixer
- preparare 2-Nitrobenzaldeide 10 mM (vedi paragrafo 4.) in dimetilsolfossido (DMSO) (questa soluzione deve essere preparata direttamente prima dell'uso. Sciogliere ad esempio 7.6 mg di 2- Nitrobenzaldeide in 5 ml di DMSO)

9.1. Gamberetti

- mescolare 1 g del campione omogeneizzato con 4 ml di acqua demineralizzata, 0.5 ml di HCl 1M e 100 μ l di 2-Nitrobenzaldeide 10 mM (in DMSO) agitando vigorosamente
- derivatizzare come descritto al paragrafo 9.3

9.2. Pesce

- mescolare 1 g del campione omogeneizzato con 3.9 ml di acqua demineralizzata, 0.5 ml di HCl 1M e 200 μ l di 2-Nitrobenzaldeide 10 mM (in DMSO) agitando vigorosamente
- derivatizzare come descritto al paragrafo 9.3

9.3. Derivatizzazione

- incubare a 50 °C (122 °F) per 3 ore
- aggiungere 5 ml di K_2HPO_4 0.1M; 0.4 ml di NaOH 1M e 5 ml di acetato di etile, agitando vigorosamente per 30 secondi.
- opzionale: possono essere eseguite incubazioni dei campioni superiori a 50 °C (122 °F) per migliorare la fase di separazione
- centrifugare: 10 min / 3000 g / temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- trasferire 2.5 ml dello strato superiore con acetato di etile in un nuovo contenitore e portare a secco
- disciogliere il residuo in 1 ml di n-esano e miscelare bene con 1 ml di diluente del campione (vedi par. 10.1.)
- centrifugare: 10 min / 3000 g / temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- utilizzare per il saggio 50 μ l della fase acquosa inferiore per ogni pozzetto

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

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

La soluzione di **anticorpi anti-AHD** (bottiglia con tappo nero) è fornita concentrata. Dal momento che la soluzione di anticorpi diluita ha una stabilità limitata, ricostituire solo il quantitativo necessario per l'analisi. Prima dell'uso, la soluzione di anticorpi concentrata deve essere agitata vigorosamente. Per la ricostituzione, diluire la soluzione di anticorpi concentrata 1:11 (1+10) nella soluzione tampone (ad esempio. 200 µl di anticorpo concentrato + 2 ml di tampone, pronto all'uso e sufficiente per 4 microstrip).

AHD coniugato è fornito concentrato. Dal momento che la soluzione di coniugato diluita ha una stabilità limitata, ricostituire solo il quantitativo necessario per l'analisi. Prima dell'uso, il coniugato concentrato deve essere agitato vigorosamente. Per la ricostituzione, diluire il coniugato concentrato 1:11 (1+10) nella soluzione tampone (ad esempio 200 µl di coniugato concentrato + 2 ml di tampone, pronto all'uso e sufficiente per 4 microstrip).

Come **tampone di lavaggio e diluente del campione, dell'anticorpo e del coniugato** è richiesto un tampone PBS-Tween. Si prega di utilizzare il sale di lavaggio contenuto nel kit (vedi paragrafo 4). Sciogliere l'intero tampone salino in 1 litro di acqua distillata. Il tampone di lavaggio pronto all'uso si conserva per circa 4-6 settimane a una temperatura di 2-8°C (35-46°F).

In alternativa: Sciogliere il contenuto della busta in soli 100 ml di acqua distillata per ottenere un tampone di lavaggio concentrato 10 volte. Diluire il tampone di lavaggio 10 volte concentrato 1:10 (1+9) con acqua demineralizzata per ottenere la soluzione di lavaggio pronta all'uso. Questa soluzione scade dopo circa 8-12 settimane se conservata a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Seguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozetti tra i vari passaggi del test.

1. Inserire un numero sufficiente di pozetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni da eseguire in duplicato. Registrare le posizioni ad essi assegnate.
2. Addizionare 50 µl di soluzione standard o di campione preparato ai pozetti corrispondenti. Utilizzare un puntale nuovo per ogni standard o campione.
3. Aggiungere 50 µl di coniugato diluito sul fondo di ogni pozetto.
4. Aggiungere 50 µl di anticorpo diluito in ogni pozetto, miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 1 h a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
5. Svuotare il liquido dai pozetti e rovesciare per tre volte di seguito la piastra su un foglio di carta assorbente picchiettandola in modo da eliminare tutto il liquido dai pozetti. Riempire i pozetti con 250 µl di diluente di lavaggio (vedi 10.1.) ed eliminare poi il liquido come descritto sopra. Ripetere la procedura di lavaggio due volte.
6. In ogni pozetto pipettare 100 µl di soluzione substrato/cromogeno. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e al buio.
7. Addizionare in ogni pozetto 100 µl di soluzione di stop (flacone con tappo giallo). Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450 nm, 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:

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

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 AHD espresse in [ng/l].

Per ottenere la concentrazione di AHD contenuta nel campione espressa in ng/kg, moltiplicare la concentrazione letta sulla curva di calibrazione per il corrispondente fattore di diluizione.

Operando secondo le procedure descritte, **il fattore di diluizione è pari a 2.**

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.