

SuperScreen TETRA HS

Saggio recettoriale per la determinazione delle tetracicline

(cod. AB710/AB711)

Superscreen Tetra HS è un kit per l'allestimento di un saggio recettoriale competitivo per la determinazione quantitativa delle tetracicline.

Il kit contiene le procedure e tutti i reagenti necessari per 96 determinazioni (cod.AB710) o 48 determinazioni (cod.AB711) inclusi gli standard.

Il risultato del saggio deve essere acquisito per mezzo di un fotometro per micropiastre (lettori ELISA manuali o automatici).

Campioni analizzabili

Miele, latte, muscolo, essudato di muscolo.

Preparazione del campione

(Macinazione), diluizione, miscelazione, (raffreddamento e centrifugazione), (filtrazione o centrifugazione).

Tempo di saggio: 90 minuti (esclusa la preparazione del campione).

Limiti di rilevazione

Miele, muscolo, essudato di muscolo: 3,75 ppb

Latte: 7,5 ppb

Specificità	
Analita	cross-reattività (%)
tetraciclina	100
ossitetraciclina	70
clortetraciclina	> 100
dossiciclina	> 100

1 PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio viene effettuato su micropiastre di polistirene precedentemente adsorbita con il competitore delle tetracicline. Nella micropiastre si aggiungono in sequenza gli standard, i campioni ed il recettore. Durante la prima incubazione si ha una competizione fra le molecole di tetraciclina, contenute nelle soluzioni standard o nei campioni, ed il competitore legato alla fase solida per il sito di legame del recettore. Segue una fase di lavaggio della micropiastre per eliminare tutto ciò che non si è legato in maniera specifica alla fase solida.

Nella seconda incubazione, si aggiunge il coniugato enzimatico che rileva il recettore rimasto legato alla fase solida. Segue nuovamente una fase di lavaggio e quindi il legame del coniugato con il recettore viene rilevato durante la terza incubazione mediante l'aggiunta di una soluzione di substrato cromogeno incolore, il quale viene convertito dall'enzima in un prodotto di reazione colorato.

Dopo aver bloccato la reazione enzimatica, l'assorbanza viene misurata mediante un lettore colorimetrico; lo sviluppo del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di tetracicline del campione.

2 MATERIALI FORNITI

Microtiter plate: Micropiastre adsorbita con il competitore delle tetracicline.

Cod.AB710: 96 pozzetti (12 strip x 8 pozzetti)

Cod.AB711: 48 pozzetti (6 strip x 8 pozzetti)

I pozzetti sono impiegabili anche singolarmente (la strip è "breakable"); per separarli sarà sufficiente estrarli dalla guaina in polipropilene e rompere il setto che li unisce.

Std Tetracycline 100 ng: 3 bottigliette in vetro scuro contenenti 100 ng di tetraciclina.

Standard diluent 1x: 1 bottiglietta in plastica con 25 ml di diluente degli standard.

Receptor: 3 bottigliette di vetro contenenti il recettore liofilizzato.

Receptor diluent: 1 bottiglietta in vetro chiaro contenente 10 ml di diluente del recettore. Tappo blu.

Enzyme conjugate: 1 vial di plastica scura contenente il coniugato enzimatico concentrato. Cod.AB710: 110µl, cod. AB711: 100 µl.

Enzyme conjugate diluent: 1 bottiglietta in vetro scuro contenente il diluente per il coniugato enzimatico.

Tappo rosso. Cod.AB710: 25 ml, cod.AB711: 15 ml.

Dilution buffer 10x: 1 bottiglia in plastica contenente 50 ml di tampone di diluizione 10x.

Washing buffer 20x: 1 bottiglia in plastica contenente 50 ml di tampone di lavaggio 20x.

Developing solution: 1 bottiglia in plastica scura contenente 15 ml di soluzione di sviluppo.

Stop solution: 1 bottiglietta in vetro chiaro contenente 9 ml di soluzione d'arresto. Tappo bianco.

3 MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Acqua distillata

Attrezzatura necessaria

- Micropipetta 20-200 µl con puntali.
- Pipetta multicanale 200-1000 µl con puntali.
- Lettore per micropiastre equipaggiato di filtro a 450 nm.
- Bilancia analitica
- Vortex V.3 - 05/12
- Filtri Whatmann 1
- Frigorifero o ghiaccio
- Centrifuga
- Tritacarne (per tessuti)

4 PRECAUZIONI PER L'USO

- Questo prodotto è destinato soltanto ad uso diagnostico *in vitro*.
- Alcuni reagenti contengono conservante. Il coniugato enzimatico è nocivo e la soluzione d'arresto contiene acido solforico ed è corrosiva.
- Manipolare i reagenti con cautela, evitando il contatto con pelle, occhi e mucose.
- Le schede dati di sicurezza delle singole componenti sono disponibili sul sito web di Tecna.

5 AVVERTENZE E MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

- Non usare i prodotti dopo la data di scadenza.
- Non mescolare le componenti di kit provenienti da lotti diversi.
- Non fotocopiare il libretto di istruzioni; usare sempre il libretto di istruzioni che si trova all'interno della scatola del kit.
- Prima di aprire le componenti (piastra e preparati liofilizzati), aspettare che il kit raggiunga la temperatura ambiente (almeno 1 ora).
- Conservare il kit a +2/+8°C e non congelare le componenti.

6 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI LAVORO

Curva di calibrazione

ATTENZIONE: Per la preparazione della curva standard e' consigliabile utilizzare un set di micropipette diverso da quello utilizzato per lo svolgimento del test.

Utilizzare come contenitori bottigliette di vetro scuro.

NON MESCOLARE CON VORTEX.

La curva deve essere preparata fresca per la seduta analitica.

Standard 100 ng: Dopo avere portato le componenti del kit a temperatura ambiente, risospendere lo std di tetraciclina in 1 ml di acqua bidistillata e attendere **1 ora** prima dell'utilizzo.

PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI PER LA CURVA STANDARD

- **10 ng/ml:** 100 µl di soluzione 100 ng/ml (appena preparata) + 900 µl di diluente degli standard.
- **5 ng/ml:** 500 µl di soluzione 10 ng/ml + 500 µl di diluente degli standard.
- **2,5 ng/ml:** 500 µl di soluzione 5 ng/ml + 500 µl di diluente degli standard.
- **1,5 ng/ml:** 360 µl di soluzione 2,5 ng/ml + 240 µl di diluente degli standard.

- **0,75 ng/ml:** 200 µl di soluzione 1,5 ng/ml + 200 µl di diluente degli standard.
- **0 ng/ml:** 500 µl di diluente degli standard.

Coniugato enzimatico: **ATTENZIONE:** in quanto il coniugato enzimatico potrebbe essere rimasto nel tappo, prima di aprire la provetta dare una centrifugata di alcuni secondi a bassa velocità (*spin-down*); subito prima della seduta analitica calcolare la quantità d'uso necessaria per la seduta in corso, quindi diluire **1/350** il coniugato enzimatico concentrato nel diluente del coniugato.

ATTENZIONE: Si consiglia di eseguire due diluizioni consecutive ed in ogni caso di non prelevare volumi di coniugato concentrato inferiori ai 20 µl.

Per esempio; preparare un semiconcentrato a **1/35** (prelevare 20 µl di coniugato enzimatico concentrato + 680 µl di diluente del coniugato) e preparare il coniugato pronto all'uso diluendo **1/10** il coniugato semiconcentrato (prelevare 400 µl di coniugato enzimatico semiconc. + 3600 µl di diluente del coniugato).

NON MESCOLARE CON VORTEX.

Recettore: Dopo avere portato a temperatura ambiente tutte le componenti del kit, risospendere il recettore liofilizzato con 2 ml di diluente del recettore. Prima di iniziare il saggio, aspettare per **1 ora** mescolando occasionalmente con leggera agitazione manuale (non usando il vortex). **ATTENZIONE: il recettore è sensibile alla temperatura, attenersi rigorosamente alle indicazioni fornite e non usare la soluzione per ulteriori sedute analitiche.**

Tampone di diluizione 10x: diluire il tampone di diluizione 10x con acqua distillata (per es. 1 + 9).

Soluzione di lavaggio: diluire la soluzione concentrata 1:20 (per esempio 25 ml + 475 ml) con acqua distillata.

Il tampone di lavaggio diluito è stabile a temperatura ambiente per 24 ore e a +2/+8°C per 2 settimane.

ATTENZIONE: nel caso siano presenti dei cristalli, portare la soluzione a temperatura ambiente e tenerla in agitazione fino al loro completo scioglimento.

Diluente del recettore: pronto all'uso.

Diluente del coniugato enzimatico: pronto all'uso.

Diluente degli standard: pronto all'uso.

Soluzione di sviluppo: pronta all'uso.

Soluzione d'arresto: pronta all'uso.

7 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

7.1 Miele

- Diluire 1 g di miele con 4 ml di tampone di diluizione.
- Miscelare su vortex per 5 minuti.
- Filtrare l'estratto su Whatmann 1.
- Aggiustare il pH a 7,4 con NaOH 0.5 N. Se si formano dei precipitati, centrifugare.

Il fattore di diluizione è 5.

7.2. Latte (tutti i tipi)

- Raffreddare il latte a +2/+8°C e centrifugarlo per 10 min a 3000xg
- Asportare il grasso.
- Diluire la parte sgrassata del latte 10 volte nel tampone di diluizione 1x (es: 100µl di latte + 900µl di tampone di diluizione).

X100= --- (%)

assorbanza dello standard 0 (B₀)

B₀

B/Bo 50%

2-6 ng/ml

Media C.V. duplicati standard

≤ 7 %

- Inserire i valori di B/Bo calcolati per ciascuno standard in un sistema di coordinate semi-logaritmiche e tracciare la curva standard.
- In base al valore in B/Bo di ciascun campione interpolare le corrispondenti concentrazioni sulla curva di calibrazione.

Per ottenere la concentrazione di tetraciclina equivalenti presente nei campioni espressa in ppb (mg/Kg o mg/l) la concentrazione letta sulla curva di calibrazione deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione applicato:

Miele, tessuti, essudato di tessuti: il fattore di diluizione è 5.

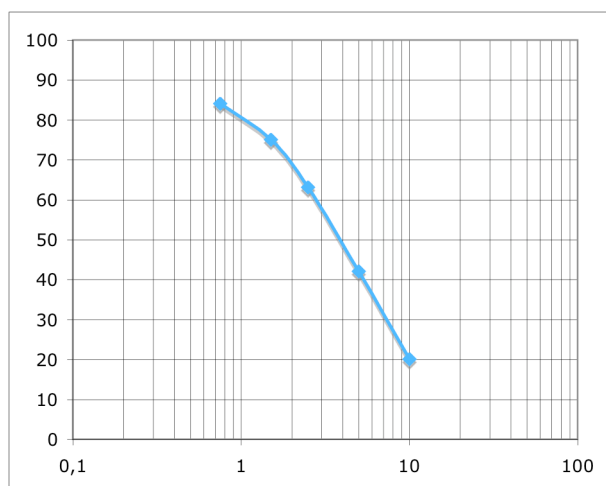
Latte: il fattore di diluizione è 10.

Per l'elaborazione dei risultati, è possibile utilizzare i fogli di calcolo scaricabili dalla sezione "download" del sito www.tecnalab.it.

10 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Dopo aver elaborato i risultati, costruendo la curva di calibrazione, è necessario verificare se il saggio ha dato risultati validi. La verifica va fatta confrontando i dati ottenuti con le specifiche del kit (vedi paragrafo 12). Qualora i valori fossero non conformi a quanto atteso, l'esito del saggio è dubbio, quindi anche i valori di concentrazione di tetraciclina equivalenti nei campioni non saranno affidabili. Si consiglia in questi casi di verificare la data di scadenza del prodotto, la lunghezza d'onda alla quale si è eseguita la lettura, nonché la procedura seguita per la realizzazione del saggio. Se non emergessero errori operativi, contattare l'assistenza tecnica. **ATTENZIONE**, in vista del reso **CONSERVARE IL KIT** integro alla temperatura indicata. Non sarà infatti possibile ottenere un kit sostitutivo in assenza del reso.

11 ESEMPIO DI CURVA STANDARD



12 SPECIFICHE DEL KIT

12.1. Specifiche del saggio

Assorbanza Media Bo

≥ 0,7 OD_{450nm}

12.2 Prestazioni del saggio

Le prestazioni del kit qui presentate sono state determinate nell'ambito di una validazione interna; in particolare, la Capacità di Rilevazione (CCβ) è stata calcolata secondo quanto previsto dalla Decisione Europea 657/2002.

Una scheda prestazioni (PDS) con maggiori dettagli è disponibile su richiesta.

Capacità di rilevazione (CCβ)

Analita: ossitetraclina

Miele	10 ppb
Latte	15 ppb
Muscolo suino	10 ppb

13 BIBLIOGRAFIA

L. Persic, B. Puppini, G. Rosar and M. Paleologo. SuperScreenTetra HS, a supersensitive enzyme-receptor assay for high throughput detection of tetracyclines in foodstuffs. Poster presentation at RAFA. November 1st-4th, 2011. Prague, Czech Republic.

F. Diana, B. Puppini, V. Bacer, E. Postogna, L. Persic and M. Paleologo. Rapid and sensitive detection of antimicrobial residues in honey by binding assays. Poster presentation at the International Conference on Beekeeping Development and Honey Marketing. 30 October - 1 November, 2010 - Hanoi, Vietnam.

14 RESPONSABILITA' LEGALE

I campioni risultati positivi con il kit dovranno essere ri-analizzati con metodi di conferma.

Tecna declina ogni responsabilità in caso di danno subito dal cliente a seguito di uso improprio dei kit forniti e delle eventuali azioni intraprese a seguito dei risultati conseguiti.

Fatte salve le vigenti disposizioni legislative europee, Tecna declina ogni responsabilità per l'eventuale utilizzo insicuro dei kit forniti.