

# I'screen CAP

## Saggio immunoenzimatico per la determinazione del cloramfenicolo (Cat.nr. HU0050001)

**I'screen CAP** è un kit per l'allestimento di un saggio immunoenzimatico competitivo per la determinazione quantitativa del cloramfenicolo.

Il kit contiene le procedure e tutti i reagenti necessari per 96 determinazioni, inclusi gli standard.

Per la valutazione del risultato è necessario un fotometro per micropiastre o per strip (lettori ELISA manuali o automatici).

### Tipologia di campioni analizzabili (matrici)

Urina, acqua, latte, siero o plasma, miele, uova, muscolo, yogurt e prodotti ittici.

**Questo kit ELISA non è destinato all'analisi di alcun tipo di campione di origine umana.**

### Preparazione del campione

- Acqua, urine (metodo I): aggiustamento pH, eventuale diluizione.
- Urine (metodo II): aggiustamento pH, idrolisi enzimatica, estrazione con etilacetato, evaporazione, risospensione.
- Siero e plasma: estrazione con etilacetato, centrifugazione, evaporazione, risospensione.
- Uova, tessuti, prodotti ittici, yogurt: omogeneizzazione, estrazione con solventi, centrifugazione, evaporazione, risospensione.
- Miele: diluizione, estrazione con etilacetato, centrifugazione, evaporazione, risospensione.
- Latte: centrifugazione, estrazione, centrifugazione, evaporazione, risospensione.

**Tempo di saggio:** 45 minuti (esclusa la preparazione del campione).

### Limite di rilevazione

Urina siero o plasma, acqua: 0,1 ppb

Latte: 0,01 ppb

Miele, uova, yogurt: 0,05 ppb

Muscolo, prodotti ittici: 0,025 ppb

| Specificità'               |                  |
|----------------------------|------------------|
| Analita                    | Cross-reattività |
| Cloramfenicolo (CAP)       | 100%             |
| Cloramfenicolo glucuronide | 70%              |
| Florfenicolo               | < 0,1%           |
| Tiamfenicolo               | < 0,1%           |

## 1. PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio viene effettuato su micropiastra di polistirene precedentemente adsorbita con anticorpi anti anticorpi di pecora. Nella micropiastra si dispensano in sequenza gli standard o i campioni, il coniugato enzimatico ed infine l'anticorpo anti-cloramfenicolo.

Durante la prima incubazione si ha una competizione fra le molecole di cloramfenicolo contenute nelle soluzioni standard e nei campioni e il cloramfenicolo legato all'enzima per gli stessi

siti di legame dell'anticorpo specifico anti- cloramfenicolo, il quale viene a sua volta catturato dagli anticorpi adsorbiti ai pozzetti della micropiastra. Tutto ciò che non si è legato viene quindi rimosso durante la successiva fase di lavaggio.

Il legame del coniugato enzimatico con l'anticorpo viene rilevato mediante l'aggiunta di una soluzione di substrato cromogeno incolore, il quale viene convertito dall'enzima in un prodotto di reazione colorato (blu).

Dopo aver bloccato la reazione enzimatica, il colore del prodotto vira da blu a giallo. L'assorbanza viene misurata con un lettore di micropiastre a 450nm. Lo sviluppo del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di cloramfenicolo contenuta nel campione e nelle soluzioni standard.

## 2. MATERIALI FORNITI

**Microtiter plate:** Micropiastra a 96 pozzetti (12 strips x 8 pozzetti) adsorbiti con anticorpi anti IgG di pecora.

*I pozzetti sono impiegabili anche singolarmente (la strip è "breakable"); per separarli sarà sufficiente estrarli dal telaio e rompere il setto che li unisce.*

**Chloramphenicol Std:** 6 bottigliette in plastica contenenti 1,5 ml di soluzioni standard di cloramfenicolo alle seguenti concentrazioni: 0 ng/ml; 0,1 ng/ml; 0,2 ng/ml; 0,5 ng/ml; 1 ng/ml; 2 ng/ml.

**CAP spiking solution:** 1 bottiglietta di plastica contenente 1 ml di soluzione di cloramfenicolo alla concentrazione di 100 ng/ml.

**Enzyme Conjugate:** 1 provetta in plastica contenente 0,2 ml di coniugato enzimatico concentrato.

**Enzyme Conjugate diluent:** 1 bottiglietta in plastica contenente 12 ml di diluente del coniugato enzimatico, soluzione rossa.

**Anti-Chloramphenicol antibody:** 1 bottiglietta in plastica contenente 12 ml di anticorpo anti-cloramfenicolo, soluzione blu.

**Dilution buffer 5x:** 1 bottiglia di plastica contenente 50 ml di tampone di diluizione 5x, soluzione arancio.

**Washing-buffer 10x:** 1 bottiglia in plastica contenente 50 ml di tampone di lavaggio 10x.

**Developing solution:** 1 bottiglia in plastica contenente 24 ml di soluzione di sviluppo.

**Stop solution:** 1 bottiglia in vetro contenente 8 ml di soluzione d'arresto. Tappo bianco.

## 3. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Acqua distillata
- Etilacetato (per tutte le matrici, tranne acqua e urine metodo I)
- Esano (per muscolo, prodotti ittici, yogurt e in alternativa, per uova)
- Acido acetico (per urine, metodo II)
- Succo di *Helix pomata* (per urine, metodo II)
- Isoottano/clorofornio (per uova)

### Attrezzatura necessaria

- Vortex.
- Omogenizzatore.
- Bilancia.
- Centrifuga
- Bagno termostato.
- Evaporatore.
- pH metro.

- Micropipetta 100-1000 µl con puntali;
- Micropipetta 20-200 µl con puntali;
- Micropipetta multicanale 20-200 µl con puntali,
- Lettore di micropiastre, filtro 450nm.

#### 4. PRECAUZIONI PER L'USO

- Il saggio è destinato soltanto ad uso diagnostico *in vitro*.
- Questo prodotto è destinato esclusivamente all'analisi di campioni di origine animale (non umana) e non è un test diagnostico per uso umano.
- Alcuni reagenti contengono soluzioni che possono essere classificate come pericolose secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008. Consultare le schede dati di sicurezza disponibili sui siti web di Eurofins Technologies ([eurofins-technologies.com](http://eurofins-technologies.com)) e di Eurofins Tecna ([tecna.eurofins-technologies.com](http://tecna.eurofins-technologies.com)).
- Manipolare i reagenti con cautela, evitando il contatto con pelle, occhi e mucose.

#### 5. AVVERTENZE E MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

- Conservare il kit a +2/+8°C e non congelare le componenti.
- **Prima dell'uso portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (almeno 1 ora). ATTENZIONE:** non aprire la busta contenente la micropiastre prima che questa abbia raggiunto la temperatura ambiente.
- Dopo l'uso riporre le strip non usate nella busta assieme all'essiccatore, risigillando la busta con la sua chiusura.
- Non usare i prodotti dopo la data di scadenza.
- Non mescolare le componenti di kit provenienti da lotti diversi.
- Non fotocopiare il libretto d'istruzioni; usare sempre il libretto di istruzioni originale che si trova all'interno della scatola del kit.
- Non apportare modifiche alla procedura del saggio, in particolar modo:
  - non variare i tempi delle incubazioni,
  - non incubare il saggio a temperature superiori ai 25°C,
  - non agitare la piastra durante le incubazioni.
- Usare sempre micropipette precise ed accurate, equipaggiate di puntali adatti.
- Una volta iniziato il test, completare tutti i passaggi senza interruzioni.
- La riproducibilità dei risultati dell'ELISA dipende in gran parte dalla cura e dalla uniformità dei lavaggi delle micropiastre; attenersi alla procedura descritta
- **Utilizzare, per ciascuna soluzione standard e per ogni campione, un puntale nuovo.**
- Non contaminare i puntali con il liquido già presente all'interno dei pozzetti.
- Non esporre la piastra alla luce diretta durante l'incubazione. Non usare coperchietti sigillanti.

#### 6. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

##### 6.1 Siero o plasma

- 1) Aggiungere 2 ml di etilacetato a 1 ml di siero/plasma.
- 2) Miscelare su vortex per 1 minuto.
- 3) Centrifugare per 10 minuti a 2000 g.
- 4) Trasferire 1 ml della fase superiore (etilacetato) in una provetta di vetro e evaporare a 50°C sotto un leggero flusso di aria (o azoto).
- 5) Risospendere il residuo con 500 µl di tampone di diluizione 1X.
- 6) Il fattore di diluizione è 1.

##### 6.2 Acqua

- 1) Aggiustare il pH a 7±0,5. Usare direttamente per il range di dosaggio 0,1-2 ppb.

- 2) Diluire 5x (1+4) in tampone di diluizione 1X per il range di dosaggio 0,5-10 ppb.
- 3) Diluire 10x (1+9) in tampone di diluizione 1X. per il range di dosaggio 1-20 ppb.

##### 6.3 Uova

- 1) Pesare in una provetta 4 g di campione omogenato.
- 2) Aggiungere 6 ml di etilacetato e miscelare vigorosamente per 10 minuti.
- 3) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 4) Trasferire 3 ml di etilacetato in un tubo di vetro ed evaporare a 50°C sotto un leggero flusso di aria (o azoto).
- 5) Risospendere il residuo con 1,5 ml di isotano/cloroformio (2:3; v:v).
- 6) Aggiungere 1 ml di tampone di diluizione 1X. Mescolare su vortex per 1 minuto o su agitatore planetario per 30 minuti.
- 7) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 8) Lasciare la miscela a 80°C per 5 minuti per eliminare l'emulsione che si verifica nella fase superiore.
- 9) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 10) Usare la fase superiore direttamente nel test.
- 11) Il fattore di diluizione è 0,5.

##### Alternativamente (dal punto 4)

- 5) Risospendere il residuo in 1,5 ml di esano.
- 6) Aggiungere 1 ml di tampone di diluizione 1X. Mescolare su vortex per 1 minuto o su agitatore planetario per 30 minuti.
- 7) Centrifugare per 10 minuti a 2000g;
- 8) Lasciare la miscela a 80°C per 5 minuti per eliminare l'emulsione che si verifica nella fase superiore.
- 9) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 10) Usare la fase inferiore direttamente nel test.
- 11) Il fattore di diluizione è 0,5.

##### 6.4 Miele

- 1) Pesare in una provetta 2 g di miele.
- 2) Aggiungere 4 ml di acqua distillata.
- 3) Riscaldare a bagnomaria a 60°C per qualche minuto.
- 4) Aggiungere 4 ml di etilacetato e miscelare vigorosamente per 10 minuti.
- 5) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 6) Trasferire 2 ml di etilacetato (fase superiore) in un tubo di vetro. **ATTENZIONE:** se il volume prelevato non si presenta limpido, centrifugare di nuovo per 10 minuti a 2000g
- 7) Evaporare a 50°C sotto un leggero flusso di aria (o azoto).
- 8) Dissolvere il residuo con 500 µl di tampone di diluizione 1X.
- 9) Il fattore di diluizione è 0,5.

##### 6.5 Muscolo e prodotti ittici

- 1) Macinare finemente il campione.
- 2) Pesare in una provetta 4 g di campione omogenato.
- 3) Aggiungere 6 ml di etilacetato e miscelare vigorosamente per 10 minuti.
- 4) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 5) Trasferire 3 ml di etilacetato in una provetta di vetro ed evaporare a 50°C sotto un leggero flusso di aria (o azoto).
- 6) Dissolvere il residuo con 1 ml di esano.
- 7) Aggiungere 500 µl di tampone di diluizione 1X e mescolare su vortex per 1 minuto.
- 8) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 9) Lasciare la miscela a 80°C per 5 minuti per eliminare l'emulsione che si verifica all'interfaccia.
- 10) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 11) Eliminare completamente la fase superiore e l'interfaccia fra le due fasi.
- 12) Usare la fase inferiore direttamente nel test.
- 13) Il fattore di diluizione è 0,25.

## 6.6 Urine

### Metodo I:

- 1) Aggiustare il pH a  $7 \pm 0,5$ . Usare direttamente per il range di dosaggio 0,1-2 ppb.
- 2) Diluire 5x (1+4) in tampone di diluizione 1X per il range di dosaggio 0,5-10 ppb.
- 3) Diluire 10x (1+9) in tampone di diluizione 1X. per il range di dosaggio 1-20 ppb.

### Metodo II:

- 1) Prelevare 1 ml di urina.
- 2) Aggiustare il pH a 4,8 aggiungendo alcune gocce di 1M acido acetico
- 3) Aggiungere 25  $\mu$ l di succo di *Helix pomatia*.
- 4) Incubare per 2 ore a 55°C, oppure tutta la notte a 37°C.
- 5) Aggiustare il pH a  $7 \pm 0,5$ .
- 6) Aggiungere 2 ml di etilacetato e miscelare su vortex per 1 minuto.
- 7) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 8) Trasferire 1 ml della fase superiore (etilacetato) in un tubo di vetro e evaporare a 50°C sotto un leggero flusso di aria (o azoto).
- 9) Risospendere il residuo con 500  $\mu$ l di tampone di diluizione 1X.
- 10) Il fattore di diluizione è 1.

## 6.7 Latte

Il latte deve essere analizzato entro 24 ore dopo la mungitura, altrimenti deve essere stabilizzato (con Bronopol o sostanze simili). **ATTENZIONE:** per stabilizzare i campioni, non utilizzare conservanti contenenti sodio azide o cloramfenicolo (es. Azidol).

- 1) Centrifugare a  $+2/+8^\circ\text{C}$  per 10 minuti a 2000 g.
- 2) Asportare il grasso.
- 3) Aggiungere 5 ml di etilacetato a 2,5 ml di latte sgrassato.
- 4) Mescolare su Vortex per 1 minuto.
- 5) Centrifugare per 5 minuti a 2000g.
- 6) Trasferire 4 ml di etilacetato (fase superiore) in un tubo di vetro e evaporare a 50°C sotto un leggero flusso di aria (o azoto).
- 7) Risospendere il residuo con 200  $\mu$ l di tampone di diluizione 1X.
- 11) Il fattore di diluizione è 0,1.

## 6.8 Yogurt

- 1) Pesare in una provetta 4 g di campione omogenato.
- 2) Aggiungere 6 ml di etilacetato e miscelare vigorosamente per 10 minuti.
- 3) Centrifugare per 10 minuti a 2000g.
- 4) Trasferire 3 ml di etilacetato in un tubo di vetro ed evaporare a 50°C sotto un leggero flusso di aria (o azoto).
- 5) Risospendere il residuo in 1,5 ml di esano.
- 6) Aggiungere 1 ml di tampone di diluizione 1X.
- 7) Mescolare su vortex per 1 minuto.
- 8) Centrifugare per 10 minuti a 2000g;
- 9) Usare la fase inferiore direttamente nel test.
- 10) Il fattore di diluizione è 0,5.

## 7. PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI LAVORO

**Standard cloramfenicolo:** pronti all'uso.

**Diluyente del coniugato:** pronto all'uso.

**Coniugato enzimatico:** **ATTENZIONE:** in quanto il coniugato enzimatico potrebbe essere rimasto nel tappo, prima di aprire la provetta centrifugare per 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 **1/200** il coniugato enzimatico concentrato nel diluyente del coniugato.

**ATTENZIONE:** Si consiglia di eseguire due diluizioni consecutive ed in ogni caso di non prelevare volumi di coniugato concentrato inferiori ai 20  $\mu$ l.

Per esempio; preparare un semiconcentrato a **1/20** (prelevare 20  $\mu$ l di coniugato enzimatico concentrato + 380  $\mu$ l di diluyente del coniugato) e preparare il coniugato pronto all'uso diluendo **1/10** il coniugato semiconcentrato (prelevare 200  $\mu$ l di coniugato enzimatico semiconc. + 1800  $\mu$ l di diluyente del coniugato).

**NON MESCOLARE CON VORTEX.**

**Anticorpo anticloramfenicolo:** pronto all'uso.

**Tampone di Diluizione 5x:** diluire il tampone di diluizione 5X (1+4) con acqua distillata.

**Tampone di lavaggio:** diluire la soluzione concentrata 1:10 (1+9) con acqua distillata. **ATTENZIONE:** nel caso siano presenti dei cristalli, portare la soluzione a temperatura ambiente ed agitare fino completo scioglimento.

Il tampone di lavaggio diluito è stabile a temperatura ambiente per 24 ore e a  $+2/+8^\circ\text{C}$  per 2 settimane.

**Soluzione di sviluppo:** pronta all'uso. **ATTENZIONE:** La soluzione è fotosensibile, conservare al riparo dalla luce diretta.

**Soluzione di arresto:** pronta all'uso. **ATTENZIONE:** contiene acido solforico 1 M. Maneggiare con cura e in caso di contatto lavarsi immediatamente con abbondante acqua.

## 8. PROCEDURA DEL SAGGIO

- 1) Predisporre la mappa della piastra, registrando le posizioni delle soluzioni standard e dei campioni, e considerando che devono essere tutti caricati in duplicato.
- 2) Prima incubazione
  - Dispensare 50  $\mu$ l di ciascuno standard/ campione nei relativi pozzetti.
  - Utilizzando la pipetta multicanale, dispensare 50  $\mu$ l di coniugato enzimatico in tutti i pozzetti.
  - Utilizzando la pipetta multicanale, dispensare 100  $\mu$ l di anticorpo anti-cloramfenicolo in tutti i pozzetti.
  - Agitare leggermente la micropiastra con movimento rotatorio per alcuni secondi.
  - Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
  - Non variare il tempo dell'incubazione e non utilizzare agitatori automatici
- 3) Modalità di lavaggio
  - Scaricare il contenuto della piastra.
  - Riempire completamente tutti i pozzetti con il tampone di lavaggio utilizzando una spruzzetta; rimuovere immediatamente il liquido dai pozzetti
  - Ripetere la sequenza per un totale di 4 lavaggi
  - Rimuovere completamente il liquido dopo il quarto lavaggio, capovolgendo la piastra più volte su di un foglio di carta assorbente.

*Non lasciare che i pozzetti si asciughino.*
- 4) Sviluppo
  - Usando la pipetta multicanale, aggiungere 200  $\mu$ l di Soluzione di Sviluppo ad ogni pozzetto
  - Agitare leggermente la micropiastra con movimento rotatorio per alcuni secondi e coprirla con il coperchietto.
  - Incubare la reazione per 15 minuti.
- 5) Usando la pipetta multicanale, aggiungere 50  $\mu$ l di Soluzione di Arresto ad ogni pozzetto e mescolare a fondo per alcuni secondi con movimento rotatorio
- 6) Misurare l'assorbanza a 450 nm.
- 7) La lettura deve essere effettuata entro 30 minuti.

## 9. CALCOLO DEI RISULTATI

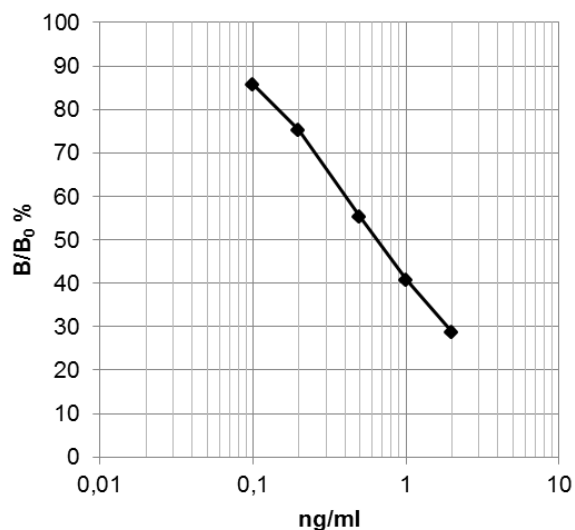
- Calcolare il valore di assorbanza medio degli standard e dei campioni.
- Dividere il valore medio di ciascun standard e campione per il valore medio di assorbanza dello standard 0 ( $B_0$ ) e moltiplicare per 100; il valore massimo di assorbanza viene posto uguale al 100% e gli altri valori sono espressi in percentuale:

$$\frac{\text{assorbanza dello standard (o dei campioni)}}{\text{assorbanza dello standard 0 (} B_0 \text{)}} \times 100 = \frac{B}{B_0} (\%)$$

- Inserire i valori di  $B/B_0$  calcolati per ciascuno standard in un sistema di coordinate semi-logaritmiche e tracciare la curva standard.
- In base al valore in  $B/B_0$  di ciascun campione interpolare le corrispondenti concentrazioni sulla curva di calibrazione. La concentrazione letta sulla curva di calibrazione deve essere moltiplicata per il relativo fattore di diluizione, come riportato nel paragrafo 6.

*Nota: Per l'elaborazione dei risultati, è possibile scaricare i fogli di calcolo dal sito Eurofins Tecna [tecna.eurofins-technologies.com](http://tecna.eurofins-technologies.com) disponibili in fondo alla pagina web dedicata al kit.*

## 10. ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE



## 11. VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Dopo aver elaborato i risultati e costruito la curva di calibrazione, è necessario verificare se il saggio ha fornito risultati validi. La verifica viene 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 cloramfenicolo nei campioni non saranno affidabili.

Si consiglia, in questi casi, di verificare la data di scadenza del prodotto, la lunghezza d'onda alla quale è stata eseguita la lettura, nonché la procedura seguita per l'esecuzione del saggio. Se non emergessero errori operativi, contattare l'assistenza tecnica.

**ATTENZIONE:** in vista del reso CONSERVARE IL KIT con tutte le sue componenti a +2/+8°C. Non sarà infatti possibile ottenere un kit sostitutivo in assenza del reso.

## 12. SPECIFICHE DEL KIT

### 12.1 Specifiche del saggio

| Descrizione              | Specifiche                     |
|--------------------------|--------------------------------|
| Assorbanza Media $B_0$   | $\geq 0,7$ OD <sub>450nm</sub> |
| $B/B_0$ 50%              | 0,3 – 1,2 ng/ml                |
| Media C.V. duplicati std | $\leq 6\%$                     |

### 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 ( $CC\beta$ ) è stata calcolata secondo quanto previsto dalla Decisione Europea 657/2002.

| Analita        | Capacità di rilevazione ( $CC\beta$ ) |                     |
|----------------|---------------------------------------|---------------------|
|                | Muscolo e prodotti ittici (ppb)       | Miele, yogurt (ppb) |
| Cloramfenicolo | 0,1                                   | 0,15                |

| Matrice                   | Recuperi |
|---------------------------|----------|
|                           | %        |
| Muscolo e prodotti ittici | 75 ± 7   |
| Yogurt                    | 115 ± 21 |

## 13. RESPONSABILITA' LEGALE

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

Eurofins 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, Eurofins Tecna declina ogni responsabilità per l'eventuale utilizzo insicuro dei kit forniti.

## 14. LETTERATURA

Diana F., Puppini B., Bacer V., Postogna E., Persic L. and Paleologo M. *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.*

Zeleny R., Emteborg H. and Schimmel H. (2010). *Assessment of commutability for candidate certified reference material ERM-BB130 "chloramphenicol in pork". Analytical and bioanalytical chemistry, 398(3), 1457-1465*