



4sensor

Test rapido per la rilevazione di β -lattamici, sulfamidici, tetracicline e chinoloni nel latte

INTRODUZIONE

Il Foursensor è un test rapido che permette di rilevare contemporaneamente la presenza di antibiotici β -lattamici, sulfamidici, tetracicline e chinoloni nel latte. Il test non richiede alcuna preparazione del campione e richiede un tempo di 10 minuti a una temperatura di 40°C (usando l'incubatore Heatsensor). Il risultato può essere ottenuto sia tramite l'interpretazione visiva del test, sia usando uno strumento di lettura (Readsensor).

X. Limits of detection (ng/ml – ppb)

| B-LACTAMS (ppb) | | TETRACYCLINES (ppb) | | SULFONAMIDES (ppb) | |
|-----------------------|-----------|---------------------------------|--------|------------------------|---------|
| Penicillines | | Tetracycline | 80-100 | Sulfadiazine | 8-10 |
| Penicillin G | 2-3 | Oxytetracycline | 60-70 | Sulfapyridine | 0.5-1 |
| Ampicillin | 3-4 | Chlortetracycline | 50-60 | Sulfathiazole | 7.5-8.5 |
| Amoxicillin | 3-4 | Doxycycline | 20-30 | Sulfamethoxazole | 320-360 |
| Oxacillin | 12-18 | (FLUORO)QUINOLONES (ppb) | | Sulfamethazine | 1-2 |
| Cloxacillin | 6-8 | Norfloxacin | 15-20 | Sulfamethoxypyridazine | 2-3 |
| Dixloxacillin | 6-8 | Enrofloxacin | 10-15 | Sulfadimethoxine | 10-15 |
| Nafcillin | 30-40 | Danofloxacin | 15-20 | Sulfacetamide | 300-600 |
| Cefalosporines | | Difloxacin | 15-20 | Sulfamerazine | 2-3 |
| Ceftiofur | 10-15 | Marbofloxacin | 10-15 | Sulfamonomethoxine | 8-12 |
| Cefquinome | 30-35 | Sarafloxacin | 15-25 | Sulfaquinoxaline | 14-18 |
| Cefazolin | 18-22 | Ciprofloxacin | 15-20 | Sulfachloropyridazine | 5-10 |
| Cefapirin | 6-8 | Flumequine | 15-30 | Sulfaguanidine | 15-25 |
| Cefacetrile | 30-40 | Oxolinic acid | 50-75 | Sulfamethizole | 220-260 |
| Cefoperazone | 3-4 | Enoxacin | 15-20 | Sulfasalazine | 250-350 |
| Cefalexin | 1000-1200 | Lomefloxacin | 20-30 | | |
| Cefalonium | 3-5 | | | | |

PROTOCOLLO

- Aggiungere 200 μ l di latte al pozzetto contenente il reagente e pipettare 10 volte per omogeneizzare il campione
- Incubare per 5 minuti a 40°C
- Immergere la striscia reattiva (strip) nel pozzetto
- Continuare l'incubazione per 5 minuti a 40°C

- Leggere l'intensità colorimetrica delle bande

MECCANISMO DI REAZIONE

Il 4sensor è un test competitivo che si basa su due componenti: il primo è un pozzetto contenente una quantità stabilita di reagente, una miscela anticorpo/recettori legati a particelle d'oro. Il secondo è una striscia con delle bande di "cattura" specifiche. La banda di controllo "Control" è stampata in rosso ed è sempre visibile. Le altre quattro bande sono specifiche per le quattro classi di inibenti: la banda per i β -lattamici è al di sotto della banda per i sulfamidici, mentre quella per le tetracicline al di sopra di queste; sopra ancora troviamo la banda per i chinoloni. Quando il reagente nel pozzetto viene risospeso con il campione di latte da analizzare, i recettori vanno a legarsi agli analiti corrispondenti se presenti nel campione durante la prima fase di incubazione per 5 minuti a 40°C. Dopodiché, quando viene inserita la striscia nel latte, il liquido inizia a risalire verticalmente su quest'ultima attraversando le bande di "cattura". Quando il campione è privo di antibiotici, le bande corrispondenti alle quattro classi di inibenti si coloreranno di rosso, indicando l'assenza di questi nel campione di latte analizzato. Al contrario, la presenza di una o di più classi di antibiotici nel campione di latte, determinerà una non colorazione delle bande reattive corrispondenti.

COMPOSIZIONE DEL KIT

Il kit 4sensor contiene tutto il necessario per 96 test:

- 12 confezioni ciascuna contenente 1 striscia da 8 pozzetti con il reagente e 8 strisce reattive
- 1 micropipetta da 200 μ L
- 1 standard positivo contenente la polvere da ricostituire di latte crudo con Penicillina G, Sulfadimetossina, Oxytetraciclina e Enrofloxacin. Per facilitarne il riconoscimento, lo standard positivo è colorato di rosa.
- 1 standard negativo contenente latte in crudo in polvere da ricostituire. Per facilitarne il riconoscimento, lo standard positivo è colorato di verde.
- Un libretto di istruzioni con il protocollo schematizzato

ALTRO MATERIALE NECESSARIO

- 1 Heatsensor da 2 o 8 posti
- 1 Readsens 2 (OPZIONALE)

NOTE GENERALI

1. Quando si riceve il kit, esso va conservato in un posto asciutto a una temperatura di 2-8°C. Prima di iniziare le analisi, prelevare dalla confezione le singole confezioni di plastica necessarie per effettuare analizzare i campioni desiderati, e riporle a temperatura ambiente evitando di esporle a fonti di luce o di calore.
2. Gli standard sono da reidratarne con 1 mL di acqua pura sterile e quindi utilizzare un vortex per sciogliere completamente la polvere ed evitare la formazione di addensati. Suddividere quindi 1 mL

dello standard ricostituito in 5 aliquote da 200 µL ciascuna e congelarle se si desidera conservarle. Una volta scongelate, si consiglia di non ricongelare più le singole aliquote.

3. Evitare di utilizzare latte cagliato o scremato. **Il campione di latte da analizzare dev'essere più omogeneo possibile:** non utilizzare per l'analisi un campione di latte in cui vi sia un fenomeno di affioramento del grasso o che sia stato precedentemente congelato.
4. La temperatura ottimale per eseguire il test è di 40 +/- 1°C. Usare l'Heatsensor (o in alternativa un bagnetto termostatico). Altri tipi di incubatore sono sconsigliati.
5. Dopo aver terminato la seconda fase di incubazione delle strisce reattive, **si consiglia di leggere il risultato immediatamente e non oltre 10 minuti.**
6. Quando le strisce si seccano, l'intensità di colore delle bande può diventare minore
7. Quando si ottiene un risultato positivo, questo dovrebbe essere confermato

Preparazione di campioni di latte in polvere

In un flacone appropriato, sciogliere 10 g di latte in polvere con 90 mL di acqua distillata calda (40°C). Per una preparazione ottimale, agitare vigorosamente.

ISTRUZIONI PER L'USO

Questa procedura è descritta per eseguire facilmente il test su un singolo campione oppure su più campioni. In tal caso, è consigliato eseguire il test in cascata evitando di perdere tempo durante le fasi di mescolamento del reagente col latte e quando si immergono e si rimuovono le strisce reattive. Assicurarsi di adottare per l'analisi di ciascun campione la stessa temperatura e gli stessi tempi d'incubazione. Si consiglia di non analizzare più di otto campioni alla volta, e se vi sono più di tre campioni, è suggerito l'uso di una pipetta multicanale.

1. Scegliere un luogo pulito e asciutto per eseguire il test. Prima di iniziare è consigliato lavarsi e asciugarsi le mani
2. Collegare l'Heatsensor e attendere finché la temperatura non si stabilizzi a 40°C
3. Prima di iniziare l'analisi, portare il kit o le singole confezioni fuori dal frigorifero e attendere affinché la temperatura dei reagenti raggiunge quella ambiente. Nel frattempo leggere le istruzioni per l'uso con attenzione;
4. Scegliere quanti campioni si vuole analizzare e scrivere su ciascun tubo un numero identificativo
5. Aprire le confezioni di plastica necessarie e prelevare un numero di pozzetti pari al numero di campioni che si vuole analizzare;
6. Inserire un nuovo puntale sulla micropipetta e trasferire 200 µL di latte a ciascun pozzetto
7. Mettere i pozzetti nel blocco riscaldante a 40°C ;
8. **Attenzione: la reazione inizia immediatamente dopo l'aggiunta del latte al pozzetto col reagente. Pipettare velocemente il campione 10 volte e far partire il tempo per la prima fase d'incubazione di 5 minuti.**
9. Durante la prima fase di incubazione, prelevare dalla confezione già aperta in precedenza le strisce reattive necessarie per il numero di analisi che si stanno eseguendo e richiudere la confezione.

Appoggiare le strisce su un foglio di carta pulito e scrivere un numero che le identifichi in base al campione corrispondente.

10. Quando i 3 minuti della prima fase d'incubazione sono conclusi, immergere le strisce reattive in ciascun pozzetto, assicurandosi di immergere le strisce al pozzetto corrispondente allo stesso numero di campione con il quale sono stati identificati in precedenza.
11. Far partire la seconda fase d'incubazione di 5 minuti.
12. Quando si è conclusa anche la seconda fase d'incubazione, prelevare le strisce reattive e appoggiarle su un foglio di carta pulito
13. Se non si ha intenzione di eseguire ulteriori analisi nello stesso giorno, riporre l'intero kit in frigorifero a 2-8°C.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI (Vedere la Figura 1)

È possibile interpretare i risultati sia tramite un'osservazione visiva, sia tramite l'utilizzo di un lettore adatto (Readsensor).

