

Charm ROSA® TEST

MRL Beta-lactam/tetracyklin

určen pro stanovení Beta-lactamových
a tetracyklinových antibiotik



Originál: Charm 2009
aktualizace 3/2010

verze 03

1. Specifikace:

Rychlý jednokrokový test určený ke stanovení beta-laktamových a tetracyklinových antibiotik v syrovém kravském mléku.



MRL BL/TET TEST

- Citlivost testů optimálně koreluje s limity MRL stanovenými legislativou EU, viz. maximální reziduální limity (tabulka 1) MRL.
- Rychlá jednokroková analýza
- Minimální nároky na vybavení
- Výsledky do 8 minut! resp. pro potřeby RF do 16 min.
- Možnost testování mléka od přeléčených dojnic, bazénových vzorků, svozných cisteren i z příjmových tanků v mlékárně.

Tabulka 1: Citlivost testu (ppb)

Beta-lactam Drug	EU / Codex MRL	Charm Detection Level Range	
		8min. incub.	16min. incub. *
Amoxicillin	4	2.5 – 4.0	1.25 – 2.0
Ampicillin	4	2.5 – 4.0	1.25 – 2.0
Cefacetrile	125	6 – 12	3.0 – 4.0
Cefalexin	100	15 – 30	8.0 – 10.0
Cefalonium	20	3 – 5	1.5 – 3.0
Cefazolin	50	8 – 16	4.0 – 5.0
Cefoperazone	50	4 – 8	2.0 – 3.0
Cefquinome	20	15 – 20	7.0 – 8.0
Ceftiofur and Metabolite*	100	10 – 20	7.5 – 10.0
Cefuroxime	50	2 – 5	1.0 – 2.0
Cephapirin	60	4 – 8	1.5 – 2.0
Cloxacillin	30	25 – 35	12.5 – 15.0
Dicloxacillin	30	20 – 30	10 – 15
Penicillin G	4	2 – 3	0.75 – 1.0
Tetracycline Drug	EU / Codex MRL	Detection Level Range	
		8min. incub.	16min. incub. *
Chlortetracycline	100	50 – 100	7.5 – 10.0
Oxytetracycline	100	50 – 100	7.5 – 10.0
Tetracycline	100	10 – 30	2.5 – 5.0

* Prodloužená inkubace pro zvýšení citlivosti dle požadavků Ruské federace
- hodnoty jsou uvedeny v ppb

Maximální prevence při kontrole ochranných lhůt, bazénových a cisternových vzorků a mlék určených pro procesní zpracování: Charm MRBL/TET byl specificky vyvinut za účelem vyřazení porušeného mléka z dodávky do zpracovatelských závodů. Představuje rychlý screeningový test určený nikoliv pouze ke kontrole beta-laktamových antibiotik, ale i pro tetracykliny, jejichž použití je při léčbě dojníc v posledních letech stále častější. Charm MRL BL/TET je kombinovaný test umožňující detekci většiny používaných beta-laktamových a 3 základních typů tetracyklinových na hranici limitu nebo pod limitem MRL. Z aktuálně používaných testů pro rezidua výše uvedených antibiotik jeho citlivost koreluje s limity MRL neoptimálněji. Test je jednoduchý, umožňuje použití v terénu i v laboratoři a vyžaduje minimální vybavení. Charm MRL BL/TET velmi rychle zachytí mléko, které přítomností antibiotických reziduí neodpovídá zdravotně bezpečným limitům a může dále rovněž způsobit zpracovatelům technologické problémy ve výrobě.

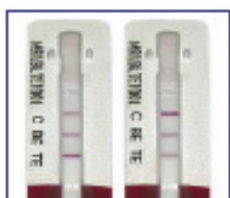
2. Pracovní postup - jednokroková analýza



- 1 U testovacího stripu odlepte částečně krycí fólii až ke stanovené značce. Do komůrky MRL BL/TET stripu napipetujte 300ml vzorku mléka. Strip znovu přelepte krycí fólií a vložte do inkubátoru.



- 2 Po 8 minutách světelná kontrolka a akustická signalizace upozorní na ukončení inkubační doby. Vyměňte MRL BL/TET strip z inkubátoru. Neprodělužujte dobu jeho setrvání v inkubátoru. Při kontrole dle požadavků RF inkubace 16 min., resp. 2x bezprostředně opakovat 8 minutový interval.



- 3 Při orientačním testování: vizuálně porovnejte Beta-laktamový proužek (BL) a tetracyklinový proužek (TE) s kontrolním proužkem (C). Při přesném testování: vložte testovací strip po inkubaci do ROSA® čtečky, která provede přesné vyhodnocení.



Další používané CHARM ROSA® testy:

- Aflatoxin M1 50 ppt
- Enrofloxacin
- MRL Beta laktam
- Tetracykliny
- Sulfonamidy
- Chloramphenicol
- Streptomycin

3. Vybavení

ROSA® čtečka



ROSA® čtečka

- Výsledky během 5 sekund
- Možnost uložení do výsledků do PC nebo vytisknutí
- Paměť na 4500 výsledků
- Možná identifikace vzorku, typu testu, či operátora, data, času, čísla šarže případně komentáře k výsledkům
- K vyhodnocení je možné použít i čtečku i2ROSA nebo iROSA

Čtyřmístný inkubátor



ROSA® čtyřmístný inkubátor

- Časovač se světelnou a akustickou indikací
- Displej se zobrazením aktuálního času (pouze u čtyřmístného typu)
- Auto Start po uzavření víka
- Auto Reset při otevření víka
- Pro 4 testovací stripy

Dvoumístný inkubátor



ROSA® dvoumístný inkubátor

- Časovač se světelnou a akustickou indikací
- Auto Start po uzavření víka
- Auto Reset při otevření víka
- Pro 2 testovací stripy

4. Detekční hladiny a objednáací informace

Úvod

Charm MRL Beta-lactam / Tetracyklin test je rychlý test využívající ROSA® technologii. Test je navržen k detekci beta-laktamových a tetracyklinových léčiv dle kodexu EU = Maximum Residual Limits (MRL) v mléce. Test je použitelný v příjmových mlékárenských laboratořích či na příjmu mléka, dále na zemědělských farmách (kontrola bazénové dodávky či přeléčených dojnic) nebo při svozu mléka, kde provádí jednoduchou a rychlou kontrolu řidič svozných cisterny před napuštěním bazénu do cisterny.

Objednáací informace

LF-MRLBLTET-100K: 100ks ROSA MRL betalaktamových a tetracyklinových testovacích stripů a 5ks MRLBLTET/TET pozitivních tablet

LF-MRLBLTET-500K: 500ks ROSA MRL betalaktamových a tetracyklinových testovacích stripů a 25ks MRLBLTET/TET pozitivních tablet

Citlivost a selektivita



120 negativních vzorků směsného syrového mléka bylo celkem hodnoceno Charm Rosa testem na MRL BL/TET. Žádný z nich nebyl vizuálně pozitivní. Rovněž při automatickém odečítání čtečkou ROSA nebyl žádný test pozitivní na beta-laktamová či tetracyklinová antibiotika.

Pozn. Přesné informace o citlivosti viz. tabulka str. 2

5. Podrobný pracovní postup

Příprava:

- Indikátor teploty inkubátoru ROSA bude svítit zeleně při dosažené teplotě 55°C. **Vlastní inkubační teplota během testu je 56 +/- 1°C**
- Inkubátor ROSA musí být čistý a postavený na rovné podložce
- **Víko inkubátoru ROSA by mělo zůstat zavřené** po celou dobu vlastní analýzy
- **Před testováním syrové mléko dobře promíchejte.** Mléko by mělo být zchlazeno (0 až 7°C).
- Syrový směsný nebo individuální vzorek je odebrán a zchlazen na 0 - 7°C při okamžitém testování. Z důvodu následného testování (centrální laboratoř, akreditovaná laboratoř, departáží vzorek...) musí být uchováván zamrazen. Pak jej lze analyzovat do 5 dnů po nadojení. Při zamrazení vzorků na teplotu -15°C nebo nižší lze zamrazené vzorky skladovat po dobu až 2 měsíců za účelem následného testování.
- Při testování zmrazeného vzorku nebo obnoveného sušeného mléka jej odstředte (3 minuty při 1200 +/- 200g) a použijte odstředěnou část pro testování.
- **Vzorky nízkotučných a odstředěných mlék vykáží zvýšenou citlivost.**

	<p>Označte beta-laktamový a tetracyklinový MRL testovací strip z důvodu identifikace vzorku a umístěte jej do inkubátoru ROSA plochou stranou nahoru. Profilovaná strana stripu s vzkovovací komůrkou by měla zapadnout do určené formy v inkubátoru. Po vložení stripu do inkubátoru inkubátoru ve vodorovné pozici odlepte část vnější krycí fólie dle označení na stripu. Při částečném odlepování se snažte nepoškodit krycí fólii.</p>
<p>Pipetujte pouze do vzkovovací komůrky naznačené na stripu.</p> 	<p>Vzorek mléka dobře promíchejte. Odeberte 300 µl (0,3 ml) mléka novou špičkou automatické pipety, kterou držte ve vertikální poloze. Použité špičky opětovně nepoužívejte. Pouze v případě, že je možné špičky opakovaně sterilizovat v autoklávu je možné jejich následné použití. Je možné také použít tzv. poly-pipety jednorázové. Pipetu držte vertikálně. Pomalu nasajte do špičky 300 +/- 15 µl (0,3 ml) mléka. Odebraný vzorek dávkujte pomalu pipetou pod bílý proužek do profilované části stripu po straně. V profilované části je umístěna tzv. vzkovovací podložka, která postupně absorbuje nadávkované mléko. Strip opatrně opětovně zalepte krycí fólií, uzavřete víko inkubátoru a zajistěte jej. Na inkubátoru ROSA bude svítit</p>

Pracovní postup

1



2



nepřerušovaně červená dioda spojená s časovačem od doby, kdy bude víko inkubátoru uzavřeno. Při použití jiného inkubátoru spusťte 8 minutový časovač. (resp. pro požadavky RF 16 min. = 2x8 min. interval).

Vlastní inkubace trvá 8 minut. Po této době začne přerušovaně blikat žlutá dioda a ozývá se přerušovaný akustický signál.

Strip neprodleně odečtěte buď vizuálně, doporučujeme však Rosa čtečku pro přesné odečtení. Neodečítejte strip po době delší než 10 minut od ukončení inkubace, pokud jej ponecháte v inkubátoru, analýza stále probíhá, což může ovlivnit přesnost analýzy. Strip při odečtení vyjměte z inkubátoru ROSA.

Buďte opatrní a nedotýkejte se profilované části stripu a vzorkovací podložky. Strip držte vertikálně a porovnejte proužek C (kontrola) s proužkem BL (Beta-laktam), event. s proužkem TE (Tetracyklin).

Vizuální interpretace výsledků:

<p>Lot Number C BL TE</p>	<p>Negativní</p>	<p>Neplatný vzorek: Pokud proužek C zcela chybí, je nerovnoměrný, špatně čitelný nebo mléko zakrývá buď proužek C, BL (Beta-laktam) nebo TE (Tetracyklin), je test neplatný. Odstraňte strip a vzorek znovu opakujte.</p> <p>Negativní vzorek: Jsou-li proužky BL (Beta-laktam) i TE (Tetracyklin) stejně tmavé nebo tmavší než proužek C (kontrola).</p> <p>Pozitivní vzorek: Je-li jeden nebo oba proužky BL (Beta-laktam) nebo TE (Tetracyklin) jasně světlejší/méně než proužek C (kontrola) nebo proužek BL či TE zcela chybí nebo je částečně nebo nerovnoměrně zbarven. Pozitivní vzorky by měly být opětovně testovány pro verifikaci výsledků (viz Kontrola operací).</p>
	<p>Pozitivní</p>	
	<p>Neplatný</p>	
<p>Umístění Vzorkovacího Stripu</p>		

Neplatný: není možné odečíst kontrolní C proužek. Vyřadte a testujte znovu.

Interpretace výsledků čtečkou:

Vložte čisté a vizuálně platné testovací proužky do odečítacího otvoru v Rosa čtečce. Dbejte, aby byly zcela zasunuty do otvoru.

Na kanálu MRL odečtete výsledky pro verzi 1.08.2 nebo nižší čtečky ROSA nebo na kanálu TETR pro verzi 1.09.00 nebo vyšší čtečky ROSA v 3 řádkovém režimu. Kanál s označením MRL nebo TETR by měl rychle blikat na displeji čtečky*. Pokud požadujete, **vložte ID vzorku a/nebo ID operátora a potvrďte ENTER****.

Za 5 sekund se na displeji zobrazí odečítaný výsledek.

Na displeji je zobrazen negativní nebo pozitivní výsledek. Pokud odečítáte kanál TETR (V. 1.09 teky ROSA nebo vyšší), bude interpretace pozitivního výsledku: „BL“ (je-li beta-laktamový test pozitivní), „TET“ (pokud je tetracyklinový test pozitivní) nebo „BLTET“ (jsou-li jak betalaktamový, tak tetracyklinový test pozitivní).

Odečtené výsledky jsou zobrazeny na vzorkovacím řádku. Výsledky jsou dále uloženy do paměti, mohou být následně vyvolány na displej, staženy do PC nebo vytištěny na termotiskárně.

* Nastavení a operace v 3 proužkovém módu viz. Manuál k obsluze čtečky ROSA.

** Pokud není strip zcela zastrčen, zobrazí čtečka chybové hlášení. Vložte strip opětovně do otvoru pro vyhodnocení a stlačte ENTER.

Testování vzorku „podezřelého z positivity“:

Opakovaně analyzujte vzorek „podezřelý z positivity“ na dvou testovacích stripech, nejlépe s jednou pozitivní a jednou negativní kontrolou (proto doporučujeme 4 místný inkubátor).

- **Negativní kontrola musí být** vizuálně **negativní** a rovněž výsledek zobrazený na čtečce musí být negativní se zobrazením číselné hodnoty nižší než -400 .
- **Pozitivní kontrola musí být** vizuálně **pozitivní** u proužků BL i TE a rovněž výsledek zobrazený na čtečce musí být pozitivní s odečtem číselné hodnoty vyšší než $+400$. **Poznámka:** čtečka by měla na kanálu TETR V1.09 odečíst výsledky Pozitivní kontroly jako „BLTET“.
- **Pokud nejsou podmínky splněny, proveďte opakovanou analýzu.** Jsou-li výsledky stále neakceptovatelné, kontaktujte místního distributora v ČR i SR.
- **Jsou-li výše uvedené podmínky splněny a jeden nebo oba z opakovaně testovaných stripů jsou pozitivní, je i analyzovaný vzorek pozitivní na beta-laktamová a/nebo tetracyklinová antibiotika.**

Doporučení při vyhodnocení výsledků:

- Hodnoty číselné $< 0 \Rightarrow$ negativní vzorky.
- Hodnoty číselné $> 0 \Rightarrow$ pozitivní vzorky.
- Hodnoty číselné 0 až $+600 \Rightarrow$ hraniční hodnoty. Těmto vzorkům věnujte zvýšenou pozornost.

Pravidelný monitoring:

Negativní a pozitivní kontrolu pro verifikaci testu provádějte denně a dále s každou novou testovací šarží i při opětovném testování vzorků „podezřelých z positivity“. Vzorek „podezřelý z positivity“ opakujte optimálně na 2 analyzních stripech, spolu s pozitivní a negativní kontrolou.

Jsou-li výsledky pozitivní a negativní kontroly správné (viz. Testování vzorku „podezřelého z positivity“) a opakovaně testovaný vzorek je pozitivní, je vzorek **beta-laktam/tetracyklin pozitivní**. Vysoké a nízké kalibrační standardy jsou dodávány k pravidelnému

monitoringu operací čtečky ROSA. Každý den a před prováděním vzorku „podezřelého z pozitivitu“ ověřte kalibraci čtečky ROSA tak, že verifikujete odečet vysokých a nízkých 3-proužkových standard v rozmezí 20% jejich tištěných průměrů. Pokud nejsou v uvedeném rozsahu, kontaktujte místního distributora v ČR nebo SR.

Kontroly:

Negativní kontrola: Použijte syrové mléko prosté beta-laktamových a tetracyklinových reziduí. (nepoužívejte pasterizované plnotučné mléko). Surové mléko prosté beta-laktamových a tetracyklinových reziduí bude vykazovat beta-laktamový a tetracyklinový test MRL ROSA silně negativní – proužek TE i proužek BL jsou tmavší než proužek C (viz. obr.).

Pozitivní kontrola: Beta-laktamový a tetracyklinový test MRL používají tzv. pozitivní standardizované tablety MRLBLTET/TET, obsahující 4,0 +/- 0,4 ppb Penicilinu G a 100 +/- 20ppb Oxytetracyklinu. Pozitivní tablety MRLBLTET/TET skladujte chlazené při 0 až 7°C. Obnovte jednu pozitivní tabletu s 5,0ml negativní kontroly (viz. výše) a dobře protřepte. Nechte odstát chlazené po dobu 5 minut a před použitím protřepte. Obnovenou pozitivní kontrolu skladujte chlazenou. Obnovená pozitivní kontrola může být použita až po dobu 48 hodin. Pro dlouhodobější skladování obnovené pozitivní kontroly zamrazte 1ml pozitivní kontroly do 6 hodin po obnovení. Zmrazené kontroly mohou být skladovány po dobu až 1 měsíce při -15°C nebo teplot nižší. Pozitivní kontrolu pomalu rozmrazujte vlažnou vodou z kohoutku a dobře promíchejte. Rozmrazená pozitivní kontrola nemusí být odstředována. Je stabilní po 24 hodin při 0 až 7°C. Rozmrazené poměrné zbytky kontrol odstraňte. Neprovádíte jejich opětovné zamrazení.

Stabilita odečítaných výsledků:

Výsledky testu mohou být odečteny do doby max. 10 minut po dokončení inkubace při uložení při pokojové teplotě (nikoliv v inkubátoru!!!). Dobu však zbytečně neprodłużujte, odečítejte, je-li to možné obratem.

6. Skladování

Beta-laktamové a tetracyklinové stripové testy MRL ROSA skladujte spolu s pozitivními kontrolními tabletami v těsně uzavřeném kontejneru, který je odolný vůči vlhku (obsahuje silikageový indikátor), při teplotě 0 až 7°C. Indikátor v kontejneru by měl zůstat modrý. Je-li růžový, vyřadte testovací stripy.

Sušené mléko a vzorky od individuálních dojnic:

Při testování obnoveného sušeného mléka nebo u individuálních vzorků od jednotlivých dojnic, které obsahují sraženinu nebo nerozpuštné částice doporučujeme odstředění (3 minuty při 1200g). Pro testování vzorku mléka použijte odstředěnou část pod vrstvou tuku. Individuální vzorky kravského mléka s tukem větším než 6,5% nebo špatně promíchané vzorky s tukem vyšším než 6,5% mohou ovlivnit přesnost analýzy. Před testováním vzorky vždy dobře promíchejte. Uvědomte si, že nízkotučné i odstředěné mléko bude mít vždy zvýšenou citlivost. Nepoužívejte testy pro pasterizované mléko.

7. Referenční karta

The diagram illustrates the correct use of a ROSA test strip. On the left, a test strip is shown in a container with a red liquid. The strip is labeled 'Lot Number C BL TE'. The strip is inserted into a device, and the result is shown on the right. The results are categorized into three types:

- NEGATIVNÍ VÝSLEDEK**: Two strips showing a red line in the C region and no lines in the BL or TE regions.
- POZITIVNÍ VÝSLEDEK**: Three strips showing a red line in the C region and two red lines in the BL and TE regions.
- NEPLATNÝ VÝSLEDEK**: Three strips showing a red line in the C region and two red lines in the BL and TE regions, but with a red line also present in the C region of the second strip, indicating an invalid result.

NEPLATNÝ: není možné odečíst kontrolní C proužek.
Vyřad'te a testujte znovu.
Pozor na správné umístění vzorkovacího stripu v ROSA čtečce

Pracovní postup

1



Ověřená inkubační teplota
 $56^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

U testovacího stripu odlepte
částečně krycí folii až ke
stanovené značce.

2



Pomalu nadávkujte 300 μl vzorku na
určenou část vzorkovací podložky umístěné
v testovací komůrce.

Strip opět přelepte a uzavřete krycí fólií.

Uzavřete víko inkubátoru a
proved'te 8 minutovou inkubaci stripu.
(v případě analýzy dle požadavku RF 16 minuto-
vou inkubaci - 2x 8min.)

3

Po inkubaci vyjměte testovací strip, vizuálně jej zkontrolujte.
Kontrolní proužek musí být celistvý
a kompletní. Výsledky odečtete v ROSA[®] čtečce na
rychle blikajícím MRL kanálu pro 3 proužkový mód.