

Charm ROSA® TEST

MRL Beta-lactam

určen pro Beta-lactamová antibiotika - porovnání citlivosti
s maximálními reziduálními limity u syrového mléka



CHARM ROSA® TEST MRL

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



MRL BL 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!
- Možnost testování mléka od přeléčených dojnic, bazénových vzorků, svozných cisteren i z příjmových tanků v mlékárně

Tabulka 1: Citlivost testu (ppb)

Typ antibiotika	MRL	Detekční hladina rozsah
Amoxicillin	4	3-4
Ampicillin	4	3-4
Cefalexin	100	30-60
Cefazolin	50	12-20
Cefquinome	20	15-20
Ceftiofur and Metabolite*	100	30-60
Cephapirin	60^	6-10
Cloxacillin	30	25-35
Dicloxacillin	30	20-30
Penicillin G	4^	2-3

Maximální prevence při kontrole ochranných lhůt, bazénových a cisternových vzorků a mlék určených pro procesní zpracování: Charm MRL 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, jejichž použití je při léčbě dojnic v posledních letech stále častější.

Charm MRL BL je kombinovaný test umožňující detekci většiny používaných beta-laktamů a 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 velmi rychle zachytí mléko, které přítomností antibiotických reziduí

neodpovídá zdravotně bezpečným limitům a může dále rovněž způsobit zpracovatelům technologické problémy ve výrobě.

* Citlivost na vlastní Ceftiofur na úrovni přibližně 1/4 hodnoty uvedené v tabulce



Další používané CHARM ROSA® testy:

- Aflatoxin M1 50 ppt
- Enrofloxacin
- MRL Beta laktam
- Tetracykliny
- Sulfadimethoxin/Sulfamethazin
- Sulfamethazin

Pracovní postup



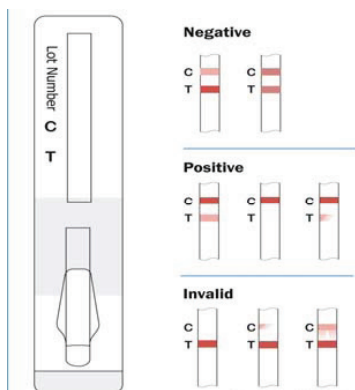
1

U testovacího stripu odlepte částečně krycí fólii až ke stanovené značce. Na MRL BL strip napipetujte 300µl 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 strip z inkubátoru. Neprodlužujte dobu jeho setrvání v inkubátoru



Při orientačním testování: vizuálně porovnejte Beta-laktamový proužek (BL) a s kontrolním proužkem (C).

Při přesném testování: vložte testovací strip po inkubaci do ROSA® čtečky a odečtete .

Vybavení

ROSA® čtečka



ROSA® čtečka

- Výsledky během 5 sekund
 - Možnost uložení 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 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

Charm MRL Beta-lactam test

Určen pro Beta-laktamová antibiotika - porovnání citlivosti s Maximálními reziduálními limity u syrového mléka.

Úvod

Charm MRL Beta-lactam test je rychlý test využívající ROSA® technologii. Test je navržen k detekci beta-laktamových 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.

Citlivost a selektivita

Citlivost – Tabulka 1: Detekční hladiny v syrovém kravském mléku v ppb (parts per billion) pro beta-lactam test ROSA MRL

Beta-laktamová léčiva	EU / Kodex MRL (ppb*)	Detekční hladina rozsah * *(ppb)
Amoxicillin	4	3 – 4
Ampicillin	4	3 – 4
Cefacetrile	125	8 – 18
Cefalexin	100	30 – 60
Cefalonium	20	3 – 5
Cefazolin	50	12 – 20
Cefoperazone	50	5 – 9
Cefquinome	20	15 – 20
Ceftiofur a Metabolite***	100	30 – 60
Cefuroxime	50	3 – 5
Cephapirin	60	6 – 10
Cloxacillin	30	25 – 35
Dicloxacillin	30	20 – 30
Penicilin G	4	2 – 3

* ppb part per billion, ug/kg nebo ng/ml

** stanovení positivity v určeném čase s 95% jistotou

*** Samostatný Ceftiofur má citlivost cca ¼ hladiny uvedené v tabulce.

Selektivita testu = při analýze nejméně 100 negativních vzorků syrového mléka je vyhodnocen max. 1 test jako pozitivní s překročením krajních limitů citlivosti s 95 % jistotou.

Interference a křížová reaktivita

U následujících léčiv nedochází k žádným interferencím (v hladině 100ppb): sulfadiazin, sulfanilamid, sulfathiazol, sulfamethazin, sulfapyridin, sulfadimethoxin, tetracyclin, oxytetracyclin, chlortetracyclin, doxycyclin, gentamicin, neomycin, furosemid, trichlormethiazid, chlorothiazid, oxytocin, thiabendazol, phenylbutazon, dexamethazon, PABA a dipyrone. Nedochází k interferencím se somatickými buňkami v množství 10^6 SCC/ml nebo bakteriemi v množství 3×10^5 cfu/ml.

Ostatní beta - laktamová léčiva jsou detekována. Oxacillin a nafcillin jsou detekovány v hladině 40 – 60, resp. 50 – 70 ppb.

Skladování

Skladování testovacích Charm stripů MRL beta-lactam a Penicilin G pozitivní kontroly dodržujte při 0 – 7°C. Detailní informace viz. příbalový leták.

Objednací informace

LF-MRLBL-100

- 1 balení se 100ks MRL beta-lactam testovacími stripy
- 5 tablet 4 ppb Penicilin G pozitivní kontroly

LF-MRLBL-500

- 5 balení po 100ks MRL beta-lactam testovacími stripy
- 25 tablet 4 ppb Penicilin G pozitivní kontroly

Spotřební materiál

- 1000ks jednorázových špiček o objemu 1000µl
- 500ks jednorázových pipet 300µl
- 5000ks jednorázových pipet 300µl

Přístroje

- ROSA čtyřmístný inkubátor 56°C
- 300µl fixní pipeta
- ROSA čtečka

Použití a skladování reagensů:

- Skladujte chlazené při 0 – 7°C v neporušeném uzavřeném obalu
- Při otevření skupinového obalu sejměte plastové víčko opatřené těsněním k opětovnému uzavření obalu. Odstraňte vnitřní ochrannou folii přivařenou k obalu.
- Zkontrolujte indikátor vlhkosti ve skupinovém obalu. Kulička uvnitř indikátoru by měla být modrá. Nepoužívejte testovací stripy v případě, že je kulička bílá nebo růžová.
- Zamezte kondenzaci vody otevřením obalu při pokojové teplotě v místech s vysokou vlhkostí
- Odeberte z obalu cca potřebný počet stripů, které spotřebujete během jednoho dne. Tyto stripy ponechte během dne při pokojové teplotě a spotřebujte do 12 hodin.
- Skupinový obal s dalšími stripy ihned důkladně uzavřete plastovým víčkem a vraťte do chladničky

Princip:

Charm MRL beta-lactam test využívá receptory vážící beta-laktamová léčiva. Při protékání mléka přes testovací komůrku a podložku stripu dochází k vyhodnocení vzorku na kontrolním proužku T testovacího stripu. Slabší intenzita T proužku je způsobena přítomností beta-laktamových antibiotik ve vzorku. T proužek je porovnán s C (kontrolním) proužkem z důvodu rozlišení event. přítomnosti beta-laktamů v hladině blízké stanoveným limitům MRL dle legislativy EU. Je-li T proužek tmavší nebo srovnatelný s C proužkem, je hodnocený vzorek negativní. Pokud je T proužek světlejší než C nebo T proužek na stripu po analýze zcela chybí, je vzorek pozitivní na beta-laktamy. V případě, že C proužek na stripu po analýze chybí je test neplatný a musí být opakován.

Pomocí dodávané čtečky (readeru) je možné analyzovat testovací stripy elektronicky.

Denní kontrola:

- Proveďte kontrolu ROSA čtečky pomocí kalibračních standardů (proužků). Tím ověřte její přesnost. Kalibrační barevné standardy (pozitivní a negativní) budou po zasunutí do čtečky automaticky odečteny a výsledky kalibrace se zobrazí na digitálním displeji. Zároveň je možné výsledky vytisknout a uchovat pro případnou kontrolu. Kalibraci provádějte denně pomocí jedné negativní a jedné pozitivní stripové kontroly. Je nutná k ověření kvality používaných reagensů, ale i čtečky. Při ověřování doporučujeme střídání operátorů.
- Negativní kontrola se musí při odečtu pohybovat v záporných číselných hodnotách, resp. hodnota zobrazená po odečtu stripu na čtečce musí být nižší než – 400. V tomto případě je potvrzen negativní výsledek.

- Pozitivní kontrola se musí při odečtu pohybovat v kladných číselných hodnotách, resp. hodnota zobrazená při odečtu stripu na čtečce musí být vyšší než +400. V tomto případě je potvrzen pozitivní výsledek.
- V případě, že kalibrační standardy nebo kontroly neobsahují přesnou specifikaci, kontaktujte dodavatele.

Negativní kontrola

Ke kontrole použijte syrové mléko prosté reziduí beta-laktamových antibiotik. Přesná negativní kontrola by měla vycházet silně negativní, odečtený T proužek bude tmavší než kontrolní C proužek (viz. vizuální kontrola a interpretace výsledků). Při odečítání na ROSA readeru bude číselná hodnota nižší než -400 a výsledek bude negativní.

Pozitivní kontrola

K přípravě pozitivní kontroly použijte Penicilin G tablety k vytvoření $4,2 \pm 0,4$ ppb Penicilin G pozitivní kontroly.

- V čisté ampulce nařed'te 1 tabletu Penicilin G pozitivní kontroly s 6 ml negativní kontroly (syrové mléko) a lehce promíchejte. Inkubujte 5 minut v chladu a před použitím znovu promíchejte.

Tablety určené k přípravě pozitivní kontroly uchovávejte chlazené při $0 - 7^{\circ}\text{C}$ v uzavřeném obalu.

Uchování kontrol

- Negativní kontrola chlazená při $0 - 7^{\circ}\text{C}$ je stabilní po 72 hodin. Přípravená pozitivní kontrola může být chlazená použita do 48 hodin.
- Pro delší skladování zamrazte 1ml pozitivní kontroly v čisté ampuli do 6 hodin po naředění při -15°C až po dobu 2 měsíců. K opětovnému použití rozmrazte ve studené vodě a lehce promíchejte. Rozmrazenou kontrolu je vhodné před použitím odstředit optimálně v centrifúze při $1200 \pm 200 \text{ G}$ po dobu 3 minut. Zchlad'te a použijte po odstředění jako testovací pozitivní standard. Napipetujte odstředěné mléko do pipety, špičku pipety ponořte hlouběji do mléka, aby nedošlo k event. odběru mléka se slabou tukovou vrstvou, která může být přítomna na povrchu mléka.
- Rozmrazená a zchlazená pozitivní kontrola je stabilní po dobu 24 hodin.
- Nepoužité zbytky rozmrazené pozitivní kontroly vyřad'te. Opětovně nezamrazujte.

Informace o testu:

- Syrové mléko musí být chlazené ($0 - 7^{\circ}\text{C}$)
- Vzorky musí být před testováním dobře promíchaný
- Teplota okolního prostředí $10 - 30^{\circ}\text{C}$ s přirozenou cirkulací vzduchu.

Upozornění:

- Vysokotučné vzorky mléka ($>6,5\%$ tuku) mohou být těžko odečitatelné, může dojít k jejich zkreslení. Neodečítejte také porušené stripy v ROSA čtečce.
- Povrchové částice přítomné na stripu mohou nepříznivě ovlivnit odečítací optiku. Udržujte proto přístroj v čistotě a před použitím odstraňte prach a zbytky mléka.
- ROSA inkubátor musí být čistý, svítí – li světelná signalizace teploty zeleně signalizuje teplotu $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Denně teplotu kontrolujte. Víko inkubátoru během testování uzavřete.
- Vyhrátí ROSA inkubátoru může v závislosti na okolním prostředí trvat $10 - 60$ minut. Při extrémních teplotách (0°C) může tato doba být ještě o 15 minut delší.

- Při testování zmrazeného vzorku nebo obnoveného sušeného mléka vzorek odstředíte (3 minuty při 1200 ± 200 G) a použijte dále spodní část vzorku.

Postup:

Krok 1

Důkladně vzorky promíchejte.

- Může dojít k vytvoření pěny na povrchu vzorku
- V jedné šarži mohou být testovány 4 vzorky

Krok 2

Označte MRL Beta-lactam testovací strip popisem vzorku

- Dejte pozor na poškození testovací části stripu. Do inkubátoru mohou být umístěny stripy nepoškozené při popisování.

Krok 3

Vložte strip do ROSA inkubátoru plochou částí nahoru.

Profilovaná spodní strana vzorkovacího stripu se vzorkovací komůrkou umožňuje jeho jednoduché uložení do inkubátoru ve správné poloze.



Krok 4

Přidrže strip v inkubátoru a odlepte vrchní ochrannou folii až k uvedené značce

- Dejte pozor na poškození a odlepené folie testovacího stripu

Krok 5

Nasajte vzorek mléka bez pěny a vzduchových bublin.

- U fixních pipet navlhčete špičku nasátím vzorku, vypuštěním, a opětovným nasátím.
- Nezvhlčujte poly-pipety pokud je používáte



Krok 6

Umístěte pipetu kolmo nad správnou vzorkovací pozici stripu. Pomalu pipetujte 300 μ l ($\pm$ 15 μ l) syrového mléka nebo odstředěného vzorku na jednu stranu vzorkovací komůrky stripu

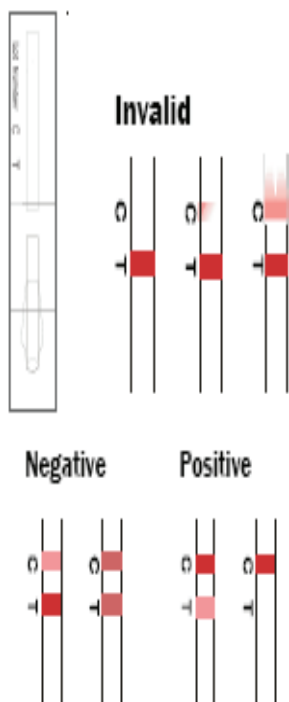
Krok 7

Opět přelepte vrchní ochrannou fólii přes testovací komůrky.

- Pokud testujete více vzorků opakujte kroky 3 – 7 (odlepení, pipetování a opětovné zalepení) u každého stripu.
- Dokončete přípravu všech vzorků během 2 minut od vložení prvního stripu do inkubátoru.

Krok 8

Uzavřete víko inkubátoru a zajistěte jej. Po uzavření víka se automaticky spustí časovač.



Krok 9

Inkubujte 8 minut, ne však déle než 10 minut. Testování zbytečně neprodlužujte. Po 8 minutách se spustí akustická signalizace nebo žlutě blikající kontrolka po dobu 2 minut.

Krok 10

Vyjměte testy z inkubátoru. Uzavřete víko, ale nezajišťujte jej.

Vizuální kontrola a interpretace:

Vyjměte testovací stripy z inkubátoru. Držte vzorek svisle testovacím polem směrem dolů [jak je zobrazeno].

Vzorkovacího pole nepoškodte. Opatrně ze stripu setřete případné nežádoucí částice.

Kontrola

Zkontrolujte C (Control) kontrolní proužek

Jestliže C proužek chybí, je rozmazán nebo je nerovnoměrný, event. pokud mléko zakrývá oba proužky C a T, je test neplatný. Opakujte test znovu. Nevkládejte neplatné stripy do čtečky.

Vizuální interpretace výsledků

Porovnejte strip s referenční kartou.

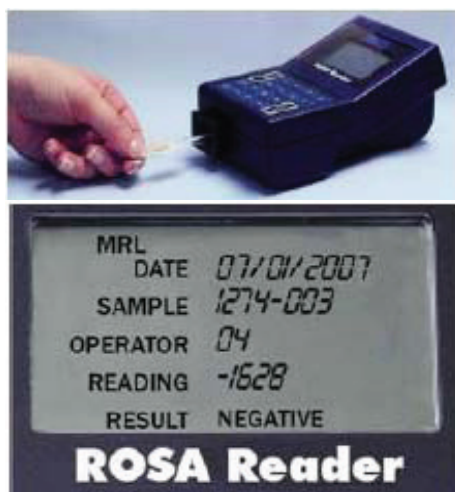
Porovnejte T (Test) proužek s C (Control) proužkem.

Negativní výsledek – T proužek je **stejně zabarvený nebo tmavší než C proužek.**

Pozitivní výsledek – T proužek je **zřetelně světlejší než C proužek nebo T proužek chybí** či je **nerovnoměrně zbarvený.**

Interpretace odečítacím zařízením

ROSA čtečka je dodávána jako volitelné příslušenství. Výsledky jsou automaticky ukládány do paměti a mohou být staženy a uloženy do PC nebo vytisknuty.



Během 10 minut od dokončení testu, vložte čistý a vizuálně neporušený strip do ROSA čtečky. Zasuňte jej celý do otvoru.

Odečtěte výsledky na **MRL** kanálu ROSA čtečky.

MRL kanál je zobrazován v levém horním rohu obrazovky a měl by pomalu blikat. K vybrání kanálu stiskněte **ESC** na čtečce a pomocí levé a pravé šipky zvolte kanál.

Použijte šipku dolů k přechodu na **vzorek** nebo **operátora** a zadejte identifikaci vzorku nebo čísla operátora. Jestliže strip nebude vložen do odečítací komory správně, bude čtečka zobrazovat chybové hlášení: „reinsert test strip and read again“ (vyjměte strip a opětovně odečtěte)

Stiskněte **ENTER** k odečtení stripu. Numerické **odečtení** a **výsledek** jsou zobrazeny na displeji po

dobu 5 sekund. Výsledky jsou dále uloženy do paměti k dalšímu vyvolání přenosu do PC nebo tisku.

- Jestliže je **odečteno záporné** číslo nebo max. 0 bude čtečka zobrazovat **negativní výsledek**.
- Jestliže je **odečteno kladné** číslo bude čtečka zobrazovat **pozitivní výsledek**. Vzorek by měl být znovu otestován pro potvrzení pozitivního výsledku pokud bude číselná hodnota kladná, ale bude se blížit nule.

Opakování zkoušky v případě positivity:

1. Pozitivní vzorek opakujte nejlépe duplicitně s pozitivní i negativní kontrolou.
2. U negativní kontroly musí být **odečet** nižší než -400 a **negativní výsledek** na čtečce.
3. U pozitivní kontroly musí být **odečet** vyšší než +400 a **pozitivní výsledek** na čtečce.
4. Jestliže jedna z kontrol není v uvedeném rozsahu opakujte test. Pokud kontrola stále nebude v požadovaném rozsahu kontaktujte svého dodavatele.
5. Jestliže jsou obě kontroly v uvedeném rozsahu a jeden nebo oba duplicitní opakované vzorky jsou **pozitivní**, je vzorek pozitivní na beta-laktamy.

Skladování vyhodnocených testovaných stripů a vzorků:

Uchovávání testovacích stripů nebo vzorků k diagnostickým nebo záznamovým účelům:

- Vzorky mohou být po testování uchovány zmrazením na -15°C po dobu dvou měsíců. Viz. **Uchování kontrol** pro rozmrazení vzorků.
- Po inkubaci testovacích stripů jsou výsledky stabilní při pokojové teplotě 10 minut. Po několika hodinách budou pozitivní výsledky více pozitivní zatímco negativní výsledky zůstanou stabilní. Při zchlazení stripů 0 – 7°C jsou výsledky stabilní 1 hodinu. Při zmrazení na -15°C jsou výsledky stabilní po dobu 1 týdne.

Poly-pipeta:



Použití poly-pipety

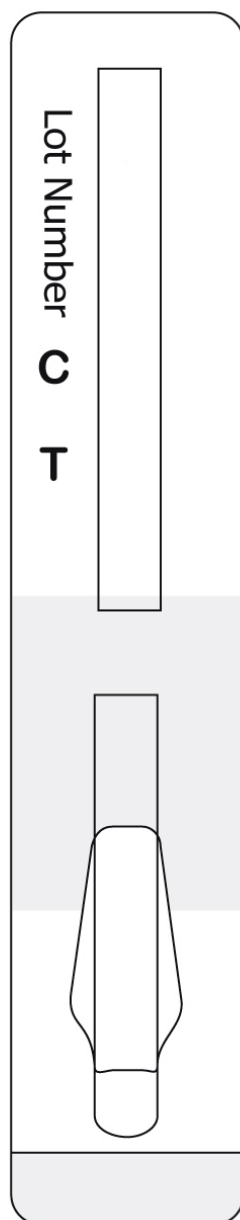
1. Uchopte poly-pipetu kolmo (jak je zobrazeno) a zmačkněte nasávací část.
2. Ponořte plastovou trubičku pipety do vzorku (přibližně 1cm pod hladinu, zamezte nasátí pěny či vzduchových bublin) a pomalu nasávací část uvolněte. Nasávání zastavte v případě, že vzorek začne přetékat do spodní části nasávací části (baňky).
3. Pipetu ze vzorku vyjměte.
4. K připojení mléka ke vzorkovacímu stripu zmačkněte nasávací/vypouštěcí část pipety a pomalu vytlačte vzorek z polypipety. Vyhněte se zpětnému nasátí mléka do polopipety po vytlačení. Přebytný (přeteklý) vzorek by měl zůstat ve spodní baňce.
5. Poly-pipeta je určena pro jedno použití, opětovně ji nikdy nepoužívejte (možnost křížové kontaminace).

Důležité informace:

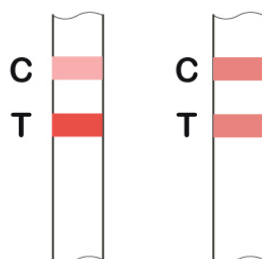
Charm Science, Inc., resp. dodavatel v ČR a SR – Rhinestone s.r.o., poskytuje záruku na tento produkt (diagnostické testy, kontroly, atd.) do konce expirační doby uvedené na každém skupinovém balení. Doba použitelnosti testů je jeden rok od data výroby.

CHARM ROSA® TEST MRLBL

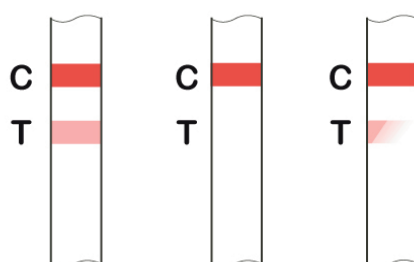
Referenční karta



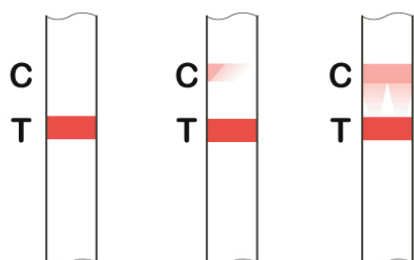
Negativný výsledek



Pozitivný výsledek



Neplatný výsledek



NEPLATNÝ: není možné odečíst kontrolní C proužek.

Vyřad'te a testujte znovu.

Pozor na správné umístění vzorkovacího stripu v ROSA čtečce

CHARM MRL - Beta laktam

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 nadávkuje 300 μ l 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.

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 2 proužkový mód.