**Charm MRL BLRFTET2 Test**

**MRL Beta-laktamový a RF Tetracyklinový test**

****

****

****



****

**Obsah**

[1. Úvod 3](#_Toc319411354)

[2. Obsah kitu a potřebné vybavení 3](#_Toc319411355)

[3. Citlivost a selektivita 3](#_Toc319411356)

[4. Skladování 4](#_Toc319411357)

[5. Interference a křížová reaktivita 4](#_Toc319411358)

[6. Zaškolení 4](#_Toc319411359)

[7. Reagencie a skladování 4](#_Toc319411360)

[8. Negativní kontrola 5](#_Toc319411361)

[9. Pozitivní kontrola 5](#_Toc319411362)

[10. Dlouhodobé skladování vzorků mléka a kontrol 5](#_Toc319411363)

[11. Denní kontrola 6](#_Toc319411364)

[12. Informace o testu 6](#_Toc319411365)

[13. Pracovní postup pro Rosa Reader (Pearl, Pearl-X) s odděleným inkubátorem: 7](#_Toc319411366)

[14. Vizuální kontrola a interpretace 7](#_Toc319411367)

15. [Kompletní přehled Charm ROSA testů 9](#_Toc319411368)

**Charm MRL Beta-laktamový a RF Tetracyklinový test pro kontrolu syrového kravského, ovčího a kozího mléka (MRLBLRFTET2)**

# Úvod

Charm MRL beta-laktamový a RF tetracyklinový test je imunoreceptorová analýza využívající ROSA (Rapid One Step Assay) laterální průtokové technologie. Vzorek mléka způsobuje obarvování testovací zóny a intenzita zbarvení testovacích proužků je vyhodnocována čtečkou ROSA Reader nebo EZ reader. Charm MRL beta-laktamový a RF tetracyklinový 2minutový test detekuje beta-laktamová léčiva na úrovni nebo pod úrovní EU / Codex MRL (maximální reziduální limity) a tetracyklinová léčiva na nebo pod úrovní importních opatření Ruské federace do 2 minut u kravského (nebo 8 minut u ovčího a kozího mléka). Test je určen pro použití v příjmových mlékárenských laboratořích, zemědělských farmách (kontrola bazénové dodávky nebo přeléčených dojnic) před napuštěním do cisterny a v kontrolních laboratořích.

# Obsah kitu a potřebné vybavení

**V každé testovací sadě Spotřební materiál Vybavení**

* MRLBLRFTET2 testovací stripy - jednorázové špičky - ROSA inkubátor
* 4 ppb Penicilin G a100 ppb - jednorázové pipety - ROSA Pearl čtečka

 Oxytetracyklin pozitivní kontrola - EZ Reader

- Návod k obsluze - Tiskárna (volitelně)

 - 300 µl pipety (volitelně)

# Citlivost a selektivita

Syrové mléko prosté beta-laktamů a tetracyklinů vychází negativně nejméně z 99% všech měření.

**Tabulka 1. Citlivost** – detekční hladiny v syrovém kravském mléce při 0 až 7 °C

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Beta-laktamová léčiva** | **Detekční rozsah † (ppb)** | **EU / CODEX MRL (ppb\*)** |
| Amoxicilin | 3-4 | 4 |
| Ampicilin | 3-4 | 4 |
| Cefacetril | 30-50 | 125 |
| Cefalonium | 3-5 | 20 |
| Cefazolin | 15-30 | 50 |
| Cefoperazon | 1-2 | 50 |
| Cefchinom | 15-20 | 20 |
| Ceftiofur a metabolity^ | 40-70 | 100 / 100 |
| Cefapirin | 6-10 | 60 |
| Cloxacilin | 10-20 | 30 |
| Dicloxacilin | 10-20 | 30 |
| Penicilin G | 1,5-2,5 | 4 / 4 |

**\*** parts per billion nebo µg/L **^** samostatný Ceftiofur má citlivost cca ¼ hladiny uvedené v tabulce

**†** pozitivita 95 % všech měření

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Tetracyklinová léčiva** | **Detekční rozsah † (ppb)** | **Požadavky Ruské federace ‡ (ppb\*)** |
| Chlortetracyklin ‡ | 6-10 | 10 |
|
| Doxycyklin | 6-10 | 10 |
| Oxytetracyklin ‡ | 6-10 | 10 |
| Tetracyklin ‡ | 6-10 | 10 |

**\*** parts per billion nebo µg/L **^** samostatný Ceftiofur má citlivost cca ¼ hladiny uvedené v tabulce

**†** pozitivita 95 % všech měření. ‡ Ruský technický předpis o mléku a mléčných výrobcích (TR TS 021/2011 a TR TS 033/2013).

# Skladování

Skladujte MRLBLTET2 testovací stripy a tablety pozitivní kontroly chlazené při 0–7 °C. Viz. Reagencie a skladování.

# Interference a křížová reaktivita

U následujících léčiv nedochází k žádným interferencím v hladině 100 ppb:

aminoglykosidy, amfenikoly, makrolidy/linkosamidy, nitrofurany, sulfa léčiva/sulfonamidy, chlorthiazid, dexametason, dipyron, furosemid, ivermektin, novobiocin, oxytocin, PABA, fenylbutazon, trichlormethiazid, thiabendazol. Další detekovaná beta-laktamová a tetracyklinová léčiva: nafcilin při 150–200 ppb, oxacilin při 15–20 ppb. Nedochází k interferencím se somatickými buňkami v množství 106 SCC/ml nebo bakteriemi v množství 3 x 105 CFU/ml.

# Zaškolení

* Nastavení a použití zařízení je jednoduché a může být provedeno podle návodu.
* Ověřovací vzorky (slepé pozitivní i negativní kódované vzorky) jsou k dispozici pro validaci.
* Pro další dotazy kontaktujte dodavatele Charm testů.

# Reagencie a skladování

Testovací soupravy není nutno posílat chlazené.

**Testovací stripy**

* Uchovávejte v chladničce v těsně uzavřeném dodaném obalu.
* Chcete-li obal otevřít, sejměte a uchovejte plastové víko s pěnovou vložkou krytou fólií pro opětovné uzavření. Krycí fólii z obalu odtrhněte a zlikvidujte.
* Pro omezení kondenzace při vysoké vlhkosti nechte nejprve obal ohřát na pokojovou teplotu (20 až 30 minut od vyjmutí z chladničky).
* Zkontrolujte indikátor vlhkosti. Kuličky ve vysoušecím sáčku by měly být modré. Nepoužívejte testovací stripy v případě, že kuličky jsou zbarvené do fialova nebo růžové.
* Vyjměte z obalu potřebný počet testovacích stripů, které spotřebujete během jednoho dne. Tyto stripy ponechte během dne při pokojové teplotě a spotřebujte do 12 hodin. Nespotřebované stripy zlikvidujte.
* Používejte dodané plastové víčko k okamžitému uzavření obalu a vrácení do chladničky.

#  Negativní kontrola

* Jako negativní kontrolu použijte syrové mléko prosté beta-laktamových a tetracyklinových reziduí, stejně tak pro rozpuštění pozitivních tablet. Nepoužívejte pasterizované nebo UHT mléko.
* Dodávaná negativní kontrola by měla vycházet silně negativní – BL a TE proužek tmavší než proužek C (viz vizuální interpretace)
* Viz. **Opakování zkoušky v případě pozitivity** pro potvrzení negativní kontroly.
* Při skladování v chladu může být negativní kontrola použita až po dobu 72 hodin.

# Pozitivní kontrola

* Charm MRL beta-laktamový a RF tetracyklinový test používá MRLBLTET / TET pozitivní tablety k přípravě 4 ± 0,4 ppb penicilin G a 100 ± 20 ppb oxytetracyklin pozitivní kontroly.
* Pozitivní tablety skladujte v chladu a v uzavřeném zip-lock sáčku odolném proti vlhkosti.
* Rozpusťte pozitivní tabletu v 5,0 ml negativní kontroly (viz výše) a dobře protřepejte. Nechte odstát v chladu po dobu 5 minut a před použitím ještě jednou protřepte.
* Obnovená pozitivní kontrola může být uchovávána v chladu po dobu 48 hodin.

# Dlouhodobé skladování vzorků mléka a kontrol

* Promíchaný vzorek zamrazte (alespoň 0,5 ml) v čisté lahvičce.
* Kontroly by měly být zmrazeny do 6 hodin od přípravy.
* Při teplotě -15 °C nebo nižší mohou být skladovány po dobu 2 měsíců.
* Vzorek pomalu postupně rozmrazujte (přes noc v chladničce nebo studenou vodou) a dobře promíchejte. V chladu je rozmrazený vzorek stabilní po dobu 24 hodin. Viditelně vysrážená bílkovina značí, že vzorek je již nepoužitelný. Jednou rozmrazený vzorek zlikvidujte. **Opakovaně nezmrazujte.**

# Denní kontrola

* **Při použití čtečky Rosa reader**
* Pro každodenní monitoring čtečky ROSA jsou k dispozici kalibrační stripy. Kontrolu kalibrace provádějte denně a před každým ověřením vzorku podezřelého z pozitivity, tím ověříte správnou funkci ROSA čtečky. Kalibrační stripy musí být odečteny ve správném rozsahu. Vyvolejte kalibrační mód čtečky ROSA stisknutím klávesy ESC, 5 a ENTER. Pokud kontrola není odečítána ve stanoveném rozsahu, kontaktujte servisní oddělení dodavatele Charm.
* Pro kontrolu zařízení a testovacích stripů proveďte před každodenním testováním vzorků jednu negativní a jednu pozitivní kontrolu.
* Viz. Opakování zkoušky v případě pozitivity

**Upozornění**

* Vysokotučné vzorky mléka (více než 6,5 % tuku) mohou způsobit neplatné výsledky. Neodečítejte takovéto stripy v ROSA čtečce.
* Tyto testy nejsou určeny pro kontrolu pasterovaného nebo sterilovaného plnotučného mléka.
* Nečistoty přítomné na povrchu stripu mohou nepříznivě ovlivnit odečítací optiku. Udržujte proto přístroj v čistotě a před použitím ze stripů odstraňte případný prach a zbytky mléka.
* ROSA inkubátor musí být čistý a teplota zobrazená na indikátoru by se měla pohybovat v rozmezí 56 ± 1 °C. Provádějte pravidelnou kontrolu teploty. Pokud neprovádíte inkubaci, nechte víko inkubátoru přivřené, ale ne úplně zavřené.
* Vyhřátí ROSA inkubátoru na provozní teplotu může trvat déle než 10 minut, v závislosti na okolní teplotě.

# Informace o testu

* Vzorek syrového mléka musí být zchlazený (0 až 15 °C).
* Test zchlazených vzorků proveďte do 72 hodin od nadojení.
* Chcete-li po testování zachovat vzorky nebo kontroly, zamrazte je při teplotě -15 °C nebo nižší. Viz. Dlouhodobé skladování vzorků a kontrol.
* Při testování zmrazeného vzorku, obnoveného sušeného mléka nebo individuálního vzorku dojnice s obsahem částic, vzorek odstřeďte (3 minuty při 1200 ± 200 g) a pro test použijte horní část. Upozorňujeme, že odstředěné vzorky s nízkým obsahem tuku přinášejí zvýšení citlivosti.
* Individuální vzorky kravského, ovčího a kozího mléka nebo špatně promíchané vzorky s obsahem tuku vyšším než 6,5 % mohou způsobit neplatné výsledky. Vzorky před testováním dobře promíchejte.
* Testy lze provádět při okolní teplotě 10 až 30 °C v prostředí s přirozeně cirkulujícím vzduchem.

**Informace k testování ovčího a kozího mléka**

* Testování směsného vzorku syrového ovčího a kozího mléka vyžaduje prodloužení inkubačního času z 2 minut na 8 minut
* K prodloužení inkubačního času na Charm EZ nebo Rosa readeru kontaktujte svého dodavatele

# Pracovní postup pro Rosa Reader (Pearl, Pearl-X) s odděleným inkubátorem:

Zkontrolujte, že teplota ROSA inkubátoru je 56 ± 1 °C. Použijte MRLBLTET2 testovací stripy. Strip do inkubátoru vložte profilovanou stranou dolů.

**Krok 1**

* **Všechny vzorky před testováním dobře promíchejte**.



**Krok 2**

* **Označte testovací stripy** popisem vzorku. Stripy mohou být

 vloženy do inkubátoru, aby nedošlo k promáčknutí rezervoáru.

**Krok 3**

* **Vložte strip do ROSA inkubátoru**
* Přidržte strip v inkubátoru a odlepte vrchní ochrannou fólii až k uvedené značce. Dejte pozor na poškození savé houbičky.

** Krok 4**

* Nasajte pipetou 300 µl mléka bez pěny a vzduchových bublin.
* Pipetu přiložte kolmo k rezervoáru s houbičkou a z jedné strany v místě indikační linie na stripu **pomalu pipetujte 300 µl** (± 15 µl).

**Krok 5**

* **Ochrannou fólií opět přelepte** vzorkovací komůrku.
* Pokud testujete více vzorků najednou, opakujte: odlepení, pipetování, opětovné přelepení u každého stripu.
* Dokončete přípravu všech vzorků během 1 minuty.

**Krok 6**

* **Uzavřete víko** inkubátoru a zajistěte jej. Automaticky se spustí časovač a rozsvítí se červená kontrolka.

**Krok 7**

* **Inkubujte 2 minuty\***, ne však déle než 3 minuty.
* Po 2 minutách se spustí alarm a začne blikat střídavě žlutá a červená kontrolka.

**Krok 8**

* **Vyjměte strip** z ROSA inkubátoru. Během odečítání držte strip vzorkovací komůrkou směrem dolu a nemačkejte ji.
* Odečtěte do 5 minut od konce inkubace.
* Víko inkubátoru přivřete, nezajišťujte jej.

**\*** Inkubujte 8 minut, ne však déle než 9 minut pokud testujete ovčí nebo kozí mléko.

# Vizuální kontrola a interpretace

Během odečítání držte strip vzorkovací komůrkou směrem dolu a nemačkejte ji. Opatrně ze stripu setřete případné nežádoucí částice.

 **Zkontrolujte C** kontrolní proužek, a pokud:

* **C** proužek chybí
* **C** proužek je rozmazaný nebo nerovnoměrný
* Pokud mléko zakrývá proužky C, BL (beta-laktam)

 nebo TE (tetracyklin). Je test neplatný.

Opakujte test znovu. Neplatné stripy nevkládejte do čtečky.

Pokud je proužek C správně vybarvený, proveďte vizuální posouzení dle přiložené tabulky.

**Interpretace odečítacím zařízením**

Výsledky MRLBLRFTET2 testů musí být odečítány pomocí

Rosa čtečky (PEARL, PEARL-X nebo EZ Reader).

 Do 5 minut od dokončení testu vložte čistý a vizuálně

 zkontrolovaný strip do čtečky Rosa jak je znázorněno.

 Zasuňte jej celý do otvoru.

 Odečtěte výsledky na kanálu **TETR** čtečky Rosa v

 3 proužkovém/3minutovém módu. Pokud to požadujete,

 může být zadána identifikace **vzorku** a/nebo **operátora**,

 potvrdit stisknutím ENTER. Na displeji se zobrazí číselná

 hodnota (**READING**) a interpretace výsledků (**RESULT**).

Výsledky jsou uloženy do paměti a mohou být zpětně vyvolány k přenosu do počítače

nebo vytisknuty.

**Negativní** – pokud je **odečtené číslo záporné** nebo

rovno nule, bude čtečka ROSA zobrazovat **negativní výsledek**.

**Pozitivní** – pokud je **odečtené číslo kladné**, bude čtečka

ROSA zobrazovat **pozitivní výsledek**. Vzorek by měl být

znovu testován. Viz. Opakování zkoušky v případě pozitivity.

**Opakování zkoušky v případě pozitivity**

1. Pozitivní vzorek opakujte nejlépe duplicitně s pozitivní i negativní kontrolou.
2. U negativní kontroly musí být odečtená hodnota nižší než -400 a výsledek na ROSA čtečce negativní.
3. U pozitivní kontroly musí být odečtená hodnota vyšší než +400 a výsledek na ROSA čtečce pozitivní.
4. Jestliže jedna z kontrol není v uvedeném rozsahu, opakujte test. Pokud kontrola nebude stále v požadovaném rozsahu, kontaktujte svého dodavatele.
5. Jestliže se obě kontroly pohybují v uvedeném rozsahu a jeden nebo oba opakovaně testované vzorky jsou pozitivní, je vzorek pozitivní na beta-laktam a/nebo tetracyklin.

# Kompletní přehled Charm ROSA testů

