

MiRA Test

Test microbiologico con spore di *Geobacillus stearothermophilus* per la ricerca di residui di antibiotici e sulfamidici nel latte.

DESCRIZIONE

Sostanze con attività antimicrobica vengono somministrate al bestiame per il trattamento terapeutico di infezioni e possono quindi essere presenti nel latte come farmaci residui. La presenza di farmaci antimicrobici residui nel latte costituisce un potenziale pericolo per il consumatore poiché queste sostanze interferiscono con la flora intestinale, possono causare reazioni allergiche e possono contribuire alla diffusione di microrganismi resistenti. La presenza nel latte di farmaci antimicrobici rappresenta, inoltre, un grave problema tecnologico per l'industria casearia, poiché le sostanze antimicrobiche interferiscono nella fermentazione del latte che è alla base di molte produzioni casearie.

La ricerca di sostanze inibenti nel latte è regolamentata in Italia dal Regolamento (UE) N. 37/2010 della Commissione del 22 dicembre 2009 concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale.

MiRA (Milk Rapid Antibiotic) Test è un test microbiologico, messo a punto per la ricerca di residui di antibiotici e sulfamidici nel latte, che fa uso di spore di *Geobacillus stearothermophilus* e di un terreno colturale studiato allo scopo.

CONTENUTO DELLE CONFEZIONI

Ciascuna confezione contiene:

- n. 50 provette contenenti un terreno colturale liquido
- n. 50 dischi contenenti spore di *Geobacillus stearothermophilus*
- 1 foglio istruzioni

PRINCIPIO DEL METODO

Il test rileva la presenza degli antibiotici e dei sulfamidici attraverso la loro azione di inibizione sulla crescita *in vitro*, a $64 \pm 0,5$ °C, di *Geobacillus stearothermophilus*. L'inibizione della crescita batterica è resa evidente dalla presenza nel terreno colturale di uno zucchero fermentabile e di un indicatore di pH.

PROCEDURA DI UTILIZZO

- Rimuovere il tappo alla provetta ed aggiungervi 1 disco di spore. Agitare delicatamente.
- Avvitare il tappo ed introdurre la provetta in un bagnomaria a $64 \pm 0,5$ °C o in Termoblock regolato a $64 \pm 0,5$ °C. Lasciare in incubazione per 20'.
- Togliere la provetta dal bagnomaria o dal Termoblock e lasciare che raggiunga la temperatura ambiente (circa 5').
- Rimuovere il tappo ed introdurre mL 1 del latte in esame.
- Preparare almeno un controllo positivo, aggiungendo ad una o più provette antibiotici/sulfamidici come riportato nel paragrafo "Controllo Qualità per l'utilizzatore".
- Avvitare il tappo alle provette e lasciare agire l'antibiotico/sulfamidico, eventualmente presente, a temperatura ambiente per 20'.
- Reintrodurre le provette nel bagnomaria o nel Termoblock a $64 \pm 0,5$ °C per una seconda incubazione della durata di 4h - 6h.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Al termine della seconda incubazione si osserva il colore del liquido nelle provette che, se verde, indica la presenza nel latte in esame di antibiotici/sulfamidici residui in concentrazione superiore ai limiti di sensibilità; al contrario, un colore giallo indica l'assenza nel latte in esame di antibiotici/sulfamidici o la loro presenza in concentrazioni inferiori ai limiti di sensibilità.

Foto 1.



Foto 1.

Risultati ottenuti con il **MiRA Test** dopo 3h 30' di incubazione a $64 \pm 0,5$ °C:

- a sinistra, mancato viraggio dell'indicatore di pH: campione di latte analita-positivo contenente antibiotici/sulfamidici residui in concentrazione superiore ai limiti di sensibilità;
- a destra, viraggio dell'indicatore di pH: campione di latte analita-negativo non contenente antibiotici/sulfamidici residui oppure contenente antibiotici/sulfamidici residui in concentrazione inferiore ai limiti di sensibilità.

CONTROLLO QUALITÀ PER L'UTILIZZATORE

Ogni lotto di **MiRA Test** viene sottoposto al controllo di qualità. Il controllo analita-negativo è ottenuto usando un campione di latte certificato biologico o di filiera. I controlli analita-positivi sono ottenuti utilizzando campioni di latte addizionati con antibiotici/sulfamidici quali gentamicina (100 µg/kg), penicillina G (4 µg/kg) e sulfadiazina (150 µg/kg).

PRECAUZIONI

Il prodotto **MiRA Test** non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente. **MiRA Test** è un dispositivo monouso da utilizzare solo per uso *in vitro*, è destinato ad un ambito professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti di agenti patogeni.

CONSERVAZIONE

Conservare **MiRA Test** a 2-8 °C nella sua confezione originale. Non conservare vicino a fonti di calore ed evitare eccessive variazioni di temperatura. In queste condizioni **MiRA Test** mantiene la sua validità fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento.

ELIMINAZIONE DEL MATERIALE USATO

Dopo l'utilizzazione, i flaconi, prima di essere smaltiti, devono essere decontaminati adeguatamente con sostanze chimiche o autoclavati.

BIBLIOGRAFIA

- DM 26/03/1992 GU n° 90 16/04/1992: Attuazione della decisione n. 91/180/CEE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente.
- CONAL Analisi e controllo qualità dei prodotti lattiero-caseari Il latte VIII/5, 356-357 (1983).
- 91/180/EEC: Commission Decision of 14 February 1991 laying down certain methods of analysis and testing of raw milk and heat-treated milk. Official Journal L 093 , 13/04/1991 P. 0001 - 0048.
- Van Oss J.L., Lameris S.A. Doodewaard J., Oostendrop J.G., Diffusion Test for the determination of antibiotic residues in milk. Neth. Milk Dairy J. 29, 16 (1975).
- International Dairy Federation International Standard FIL-IDF 57:1970 Detection of penicillin in milk by a disk assay technique (1970).
- Deborah Currie, Lorraine Lynas, D. Glenn Kennedy and W. John McCaughey. Evaluation of a modified EC Four Plate.
- Method to detect antimicrobial drugs. Food Additives and Contaminants, 1998, Vol. 15, No. 6, 651-660.
- Regulation 37/2010 EC.

PRESENTAZIONE


Prodotto	REF	
MiRA Test	80355	50 test

Tabella 1: Sensibilità del **MiRA Test** ad alcuni antibiotici/sulfamidici, comunemente usati in medicina veterinaria e rispettivo valore di MRL (Maximum Residue Limits) valido per l'Europa¹.

Tabella 1

ANTIBIOTICO/SULFAMIDICO	MRL per il latte¹ MAXIMUM RESIDUE LIMITS (µg/kg)	Sensibilità del MiRA Test in 6h LIMITI DI SENSIBILITÀ (µg/kg)
BETA-LATTAMICI		
Penicillina G	4	2-4
Ampicillina	4	2-4
Oxacillina	30	<10
Cloxacillina	30	<10
Dicloxacillina	30	<10
Amoxicillina	4	2-4
Benzilpenicillina	4	2-4
Naficillina	30	15-30
Penethamate	4	2-4
Cefalexina	100	50-100
Cefazolina	50	25-50
Ceftiofur	100	50-100
Cefapirina	60	5-10
Cefquinome	20	10-20
TETRACICLINE		
Tetraciclina	100	50-100
Clortetraciclina	100	50-100
Ossitetraciclina	100	50-100
MACROLIDI		
Eritromicina	40	<10
Tilosina	50	25-50
Tilmicosina	50	20-40
Spiramicina	200	100-200
LINCOSAMIDI		
Lincomicina	150	75-150
Pirlimicina	100	<50
AMINOGLICOSIDI		
Gentamicina	100	50-100
Neomicina	1500	<100
Streptomicina	200	<100
Diidrostreptomicina	200	<100
SULFAMIDICI		
Sulfadiazina	100	<150
SULFANILAMIDI		
Sulfadimidina	100	<200
BENZIL PIRIMIDINE		
Trimetoprim	50	25-50
CHINOLONI		
Flumequina	50	50-100
Enrofloxacin	100	50-100
NOVOBIOCINA		
Novobiocina	50	100-200

¹ Regulation 37/2010 EC.

TABELLA DEI SIMBOLI

 LOT Codice del lotto	 Non riutilizzare	 Fabbrikante	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Limiti di temperatura
 REF Numero di catalogo	 Fragile, maneggiare con cura	 Utilizzare entro	 Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	



LIOFILCHEM® S.r.l.

Via Scozia Zona Ind.le - 64026 Roseto D.A. (TE) - Italy

Tel. +390858930745 Fax +390858930330 Website: www.liofilchem.net E-Mail: liofilchem@liofilchem.net

Rev.4 / 06.03.2013

Microbiological test with spores of *Geobacillus stearothermophilus* for the detection of antibiotic and sulphamide residues in milk.

DESCRIPTION

Antimicrobial substances are given to cattle for therapeutic treatment of infections and so they can be present in milk as residual drugs. The presence of residual antimicrobial drugs in milk is a potential hazard for the consumers since those substances interfere with the intestinal flora, can cause allergic reactions and can contribute to the spreading of resistant microorganisms.

Furthermore, the presence of antimicrobial drugs in milk is a serious technological problem for dairy industry, since antimicrobial substances interfere with milk fermentation which is the basis of many dairy productions.

The detection of inhibiting substances in milk is ruled in Europe by the Regulation 37/2010 EC.

MiRA (Milk Rapid Antibiotic) Test is a microbiological test, set for the detection of residual antibiotics and sulphamides in milk, that uses spores of *Geobacillus stearothermophilus* and a culture medium designed for that purpose.

CONTENT OF THE PACKAGE

Each package contains:

- n. 50 tubes containing liquid culture medium
- n. 50 discs containing spores of *Geobacillus stearothermophilus*
- 1 instructions sheet

PRINCIPLE OF THE METHOD

The test detects residues of antibiotics and sulphamides through their inhibition action against the growth *in vitro*, at $64 \pm 0,5$ °C, of *Geobacillus stearothermophilus*. The inhibition of bacterial growth is made evident by the presence of a fermentable sugar and a pH indicator in the culture medium.

PROCEDURE FOR USE

- Remove the cup from the tube and add 1 disc of spores. Shake gently.
- Put the cup and introduce the tube in a waterbath at $64 \pm 0,5$ °C or in a Termoblock set at $64 \pm 0,5$ °C. Incubate for 20'.
- Remove the tube from the incubator and let it reach room temperature (roughly 5').
- Remove the cup and introduce 1 mL of the milk under test.
- Prepare one or more analyte-positive controls, by the addition of antibiotic/sulphamide into the tubes as indicated in the paragraph "Quality Control for the user".
- Put the cup to the tube and let the antibiotic/sulphamide, if present, act at room temperature for 20'.
- Reintroduce the tube in the waterbath or in the Termoblock at $64 \pm 0,5$ °C for the second incubation for 4h - 6h.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

At the end of the second incubation observe colour of the liquid in the tubes that, if green, indicates antibiotic/sulphamide residues in the examined milk in concentrations above the detection limits; otherwise, a yellow colour indicates the absence of antibiotic/sulphamide residues in the examined milk or their presence in concentrations under the detection limits.

Photo 1.



Photo 1.

Results obtained by **MiRA Test** after 3h 30' of incubation at $64 \pm 0,5$ °C:

- in the left side, no colour change of the pH indicator: analyte-positive milk sample containing antibiotic/sulphamide residues in concentration above the detection limits;
- in the right side, colour change of the pH indicator: analyte-negative milk sample containing no antibiotic/sulphamide residues or containing antibiotic/sulphamide residues in concentration under the detection limits.

USER QUALITY CONTROL

Every batch of **MiRA Test** is submitted to quality control. The analyte-negative control is obtained using a certified milk sample free of antibiotics. The analyte-positive controls are obtained using milk samples with the addition of antibiotics/sulphamides such as gentamicin (100 µg/kg), penicillin G (4 µg/kg) and sulphadiazine (150 µg/kg).

PRECAUTIONS

The product **MiRA Test** is not classified as dangerous under current legislation. **MiRA Test** is a disposable device to be utilized only for *in vitro* use, it is intended for use in a professional environment and must be used in laboratory by properly trained personnel, using approved asepsis and safety methods for handling pathogenic agents.

STORAGE

Store **MiRA Test** at 2-8 °C in its original packaging. Keep away from heat sources and avoid excessive temperature changes.

In such conditions **MiRA Test** will remain valid until the expiry date indicated on the label. Do not use beyond that date.

Eliminate without using it if there are deterioration signs.

DISPOSAL

After use and before disposal, tubes must be properly decontaminated with chemical substances or autoclaved.

BIBLIOGRAPHY

- DM 26/03/1992 GU n° 90 16/04/1992: Attuazione della decisione n. 91/180/CEE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente.
- CONAL Analisi e controllo qualità dei prodotti lattiero-caseari Il latte VIII/5, 356-357 (1983).
- 91/180/EEC: Commission Decision of 14 February 1991 laying down certain methods of analysis and testing of raw milk and heat-treated milk. Official Journal L 093 , 13/04/1991 P. 0001 - 0048.
- Van Oss J.L., Lameris S.A. Doodewaard J., Oostendrop J.G., Diffusion Test for the determination of antibiotic residues in milk. Neth. Milk Dairy J. 29, 16 (1975).
- International Dairy Federation International Standard FIL-IDF 57:1970 Detection of penicillin in milk by a disk assay technique (1970).
- Deborah Currie, Lorraine Lynas, D. Glenn Kennedy and W. John McCaughey. Evaluation of a modified EC Four Plate.
- Method to detect antimicrobial drugs. Food Additives and Contaminants, 1998, Vol. 15, No. 6, 651-660.
- Regulation 37/2010 EC.

PRESENTATION


Product	REF	
MiRA Test	80355	50 tests

Table 1: Sensitivity of **MiRA Test** to some antibiotics/sulphamides, commonly used in veterinary medicine and respective MRL (Maximum Residue Limits) values valid for Europe¹.

Table 1

ANTIBIOTIC/SULPHAMIDE	MRL for milk ¹ MAXIMUM RESIDUE LIMITS (µg/kg)	MiRA Test Sensitivity in 6h DETECTION LIMITS (µg/kg)
BETA-LACTAMS		
Penicillin G	4	2-4
Ampicillin	4	2-4
Oxacillin	30	<10
Cloxacillin	30	<10
Dicloxacillin	30	<10
Amoxicillin	4	2-4
Benzylpenicillin	4	2-4
Nafcillin	30	15-30
Penethamate	4	2-4
Cefalexin	100	50-100
Cefazolin	50	25-50
Ceftiofur	100	50-100
Cephapirin	60	5-10
Cefquinome	20	10-20
TETRACYCLINES		
Tetracycline	100	50-100
Clortetracycline	100	50-100
Oxytetracycline	100	50-100
MACROLIDES		
Erythromycin	40	<10
Tylosin	50	25-50
Tilmicosin	50	20-40
Spiramycin	200	100-200
LINCOSAMIDES		
Lincomycin	150	75-150
Pirlimycin	100	<50
AMINOGLYCOSIDES		
Gentamicin	100	50-100
Neomycin	1500	<100
Streptomycin	200	<100
Dihydrostreptomycin	200	<100
SULPHAMIDES		
Sulfadiazine	100	<150
SULFANILAMIDES		
Sulfadimidine	100	<200
BENZIL PIRIMIDINE		
Trimethoprim	50	25-50
QUINOLONES		
Flumequine	50	50-100
Enrofloxacin	100	50-100
NOVOBIOCIN		
Novobiocin	50	100-200

¹ Regulation 37/2010 EC.

TABLE OF SYMBOLS

LOT Batch code	 Do not reuse	 Manufacturer	 Contains sufficient for <n> tests	 Temperature limitation
REF Catalogue number	 Fragile, handle with care	 Use by	 Caution, consult accompanying documents	



LIOFILCHEM® S.r.l.

Via Scozia Zona Ind.le - 64026 Roseto D.A. (TE) - Italy

Phone +390858930745 Fax +390858930330 Website: www.liofilchem.net E-Mail: liofilchem@liofilchem.net

Rev.4 / 06.03.2013