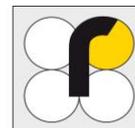


r-biopharm®



RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E

Art. Nr.: R4101

Test immunoenzimatico per il dosaggio di enterotossine A, B, C, D, E dello Stafilococco in alimenti e colture batteriche

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
www.r-biopharm.com

Per informazioni:

Telefono: (0 61 51) 81 02-0

Centralino

Telefax / E-Mail: (0 61 51) 81 02-20
Ordini orders@r-biopharm.de

Marketing: (0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

Distribuito da:

R-Biopharm Italia Srl
Via Morandi, 10
20077 Melegnano MI
Telefono 02 9823 3330
info@r-biopharm.it - www.r-biopharm.com

RIDA® e RIDASCREEN®
sono marchi registrati della R-BIOPHARM AG
Produttore: R-BIOPHARM AG, Darmstadt, Germania

R-BIOPHARM AG è certificata ISO 9001

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E

Introduzione

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E (Art. No.: R4101) è un immunodosaggio enzimatico per la determinazione di enterotossine A, B, C, D ed E dello *Staphilococcus* in alimenti fluidi e solidi nonché in colture batteriche.

Tutti i reagenti richiesti per il dosaggio sono contenuti nel kit.

Il kit è sufficiente per 12 determinazioni.

Per la quantificazione è richiesto un lettore colorimetrico per micropiastre.

Preparazione campioni: estrazione secondo un metodo semplificato per il trattamento dei campioni (parzialmente applicabile, vedi paragrafo 9. "Preparazione del campione") mediante omogeneizzazione con il tampone e preparazione del campione

Estrazione secondo "il metodo di preparazione ufficiale europeo" (metodo di concentrazione dialisi, vedi paragrafo 9.5).

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni)..... ca. 1 h
(metodo semplificato)

preparazione dei campioni (10 campioni).....ca. 19 h
(metodo ufficiale, dialisi overnight)

esecuzione del test (incubazione).....2h e 45 min

Limite di rilevabilità:

metodo semplificato	campioni liquidi.....	0.25 ng/ml di tossina
	campioni solidi.....	0.375 ng / g di tossina
	surnatante colture batteriche.....	0.25 ng /ml di tossina
concentrazione dialisi	campioni liquidi.....	0.05 ng/ml di tossina
	campioni solidi.....	0.05 ng / g di tossina

La specificità del test RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E è stata determinata analizzando le reattività incrociate alle sostanze corrispondenti nel sistema tampone. Nei campioni, la specificità può discostarsi da quelle determinate nel sistema tampone a causa degli effetti della matrice. Prima dell'analisi delle sostanze reattive incrociate, l'utente deve determinare il limite di rilevabilità e il recupero per la sostanza nella rispettiva matrice campione. Il test non può discriminare tra analiti e sostanze reattive incrociate.

Al fine di aumentare la qualità delle prestazioni durante l'esecuzione di procedure ELISA, si prega di far riferimento al nostro Good ELISA Practice (GEP) – Manuale nella versione aggiornata. Qui si elencano gli standard minimi riguardanti le condizioni di lavoro quando si utilizzano i kit di R-Biopharm AG e si eseguono test ELISA. Il manuale può essere visionato, stampato e scaricato direttamente dal nostro sito <http://www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis>.

Prodotti correlati:

RIDASCREEN® SET Total (R4105; 96 determinazioni)

RIDASCREEN® SET Total (R4106; 48 determinazioni)

1. Scopo

RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E è un immunodosaggio enzimatico a sandwich per la determinazione di enterotossine dello *Staphilococcus* (SET) A,B,C,D,E in alimenti fluidi e solidi nonché in colture batteriche. Grazie alla sua sensibilità il test RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E è chiaramente superiore alla procedura di immunodiffusione che ha un limite di rilevabilità di 0.1 mg/ml.

2. Generale

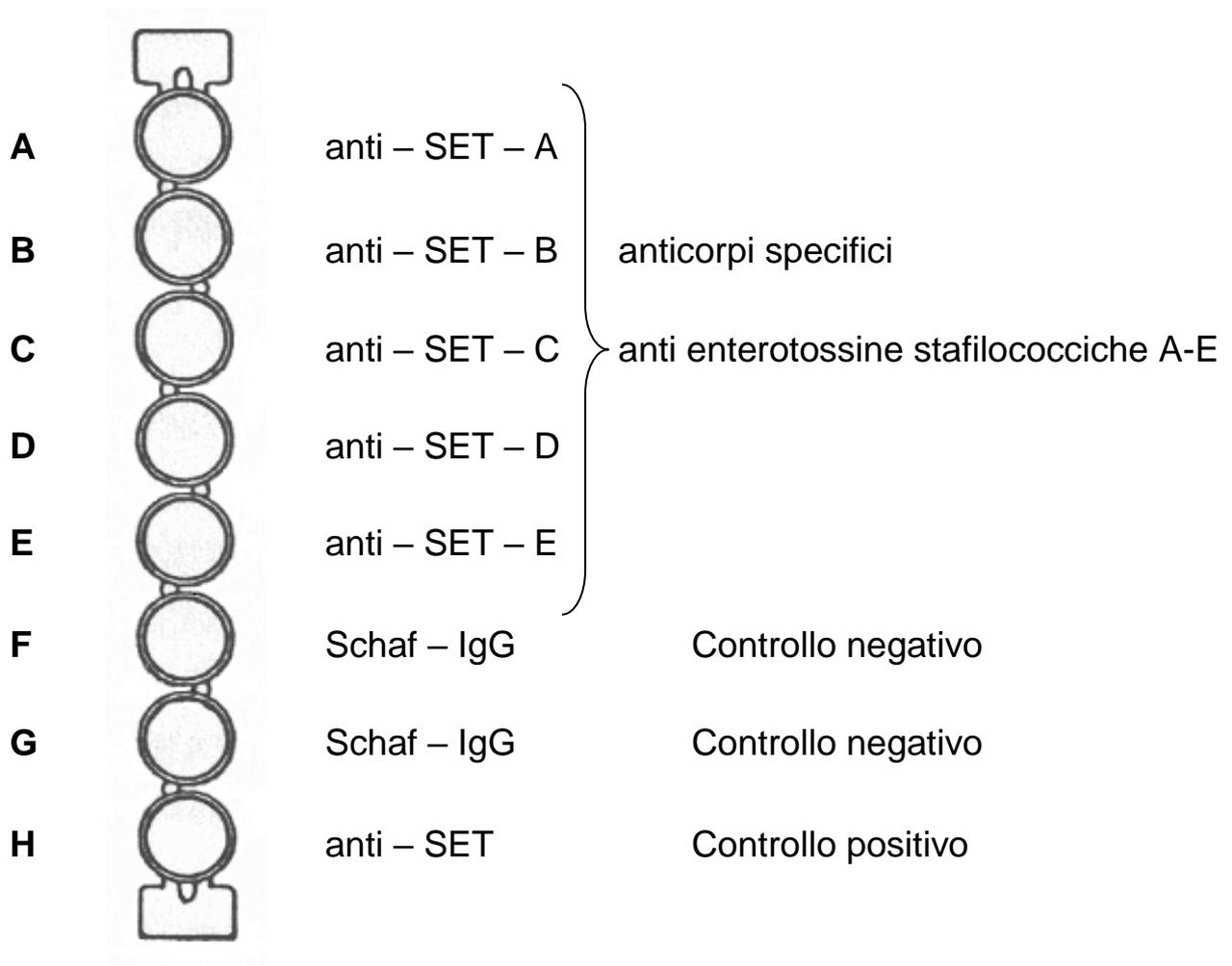
Gli stafilococchi appartengono alla famiglia dei micrococchi. Lo *Staphilococcus aureus* e lo *Staphilococcus hyicus* producono una o più proteine termostabili note come enterotossine. Queste sono gli agenti eziologici di una serie di casi di intossicazione alimentare.

Accanto alla *Salmonella*, la causa maggiore di intossicazioni alimentari sono le enterotossine dello *Staphilococcus aureus*. In generale, una popolazione di 5×10^5 cellule di *Staphilococcus aureus* in grado di produrre le enterotossine per grammo di alimento è sufficiente a causare un'intossicazione alimentare. Comunque sia, altri studi hanno evidenziato che anche solamente 100-200 ng di enterotossine stafilococciche possono portare a sintomi di intossicazione alimentare.

Le intossicazioni da SET sono associate frequentemente alla pasta, a prodotti a base di carne, latte, latticini, gelati, ovo-prodotti, insalate, pane, torte, prodotti di pasticceria, ripieni e alimenti prodotti con essi. Particolarmente significative sono le enterotossine dei gruppi serologici A, B, C, D, E.

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti A-E ed H delle microstrip sono coattati con anticorpi specifici anti enterotossine stafilococciche A, B, C, D ed E, i pozzetti F e G servono da controllo e sono coattati con anticorpi di animali non-immunizzati come nello schema seguente:



Strip di microtitolazione del saggio immunoenzimatico RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E

Questa sequenza si ottiene se la strip è inserita correttamente nel supporto (inserto terminale grande → sopra, inserto terminale piccolo → sotto).

Aggiungendo le soluzioni campione ai pozzetti A – G (vedi lettere sul lato sinistro del supporto) e il controllo positivo nel pozzetto H, le tossine presenti si legano agli anticorpi di cattura specifici. I componenti del campione non legati agli anticorpi sono rimossi durante il lavaggio. Le tossine immobilizzate vengono legate da una miscela di anticorpi specifici coniugati con biotina. Tutto il coniugato che non si è legato viene rimosso durante il successivo lavaggio. Dopo l'aggiunta di Streptavidina-POD nonché di una ulteriore fase di lavaggio, la determinazione viene eseguita aggiungendo la soluzione di substrato/cromogeno. Il coniugato Streptavidina-POD legato trasforma il cromogeno rosso in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di arresto provoca un viraggio del colore da blu a giallo. La lettura è eseguita con un fotometro a $450/620 \pm 10$ nm; l'assorbanza è proporzionale alla concentrazione di SET nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per l'analisi di 12 campioni (della piastra da 96 pozzetti è necessaria una striscia di 8 pozzetti singoli per singolo test). Ogni kit contiene:

Componente	Colore tappo	Formato		Volume
Micropiastra	-	pronta all'uso		96 pozzetti
Controllo positivo	rosso	pronto all'uso	colore rosso	2ml
Tampone di lavaggio	marrone	Concentrato	10 x	100 ml
Coniugato 1	rosso	pronto all'uso	colore verde	11 ml
Coniugato 2	nero	pronto all'uso	colore blu	11 ml
Substrato/Cromogeno	marrone	pronto all'uso	colore rosso	13 ml
Soluzione di Stop	giallo	pronto all'uso		14 ml

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- bilancia analitica e contenitori per pesare
- macinino, miscelatore o equivalente per l'omogeneizzazione del campione. Per il siero di latte in polvere e per tutte le matrici alimentari difficili da miscelare, si raccomanda l'uso del turrax per ottenere un campione omogeneo.
- flaconi da 50ml
- opzionale: cartucce da filtro sterili
- micropipette da 100 μ l
- incubatore 35-37 °C (95-98.6 °F)
- pipetta multicanale o lavatore per micropiastre
- opzionale: lettore per micropiastre (450/620 \pm 10 nm)

Ulteriore attrezzatura necessaria per la preparazione del campione secondo il metodo ufficiale di screening europeo (EOSM), versione 5, Settembre 2010:

Nota generale: Si raccomanda vivamente di utilizzare contenitori in vetro o in polipropilene (esempio provette, imbuti, beakers, vials) per evitare l'assorbimento di tossine.

- Shaker per beakers (temperatura ambiente)
- Centrifuga, da 3.130 a 10.000 g, in grado di essere refrigerata a 4°C e provette per centrifuga
- Membrana per dialisi, MWCO: 6 – 8 kD, larghezza piatto: 23 \pm 2 mm (esempio Spectra/Por[®]1, ref: 132 650, Spectrum)
- Chiusure, larghezza di tenuta = 35 mm (esempio Spectra/Por[®], ref: 132 736, Spectrum)
- pH-metro
- Provette da 50 ml
- Imbuto
- Lana di vetro
- Contenitore
- Frigorifero (5 \pm 3 °C/41 \pm 5.4 °F) e freezer (\leq -18 °C/ \leq -0.4 °F)
- Vortex
- Lettore per micropiastre (450/620 \pm 10 nm)

5.2. Reagenti:

- tampone PBS, pH 7.4 (0.55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 2.85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 8.7 g NaCl portare a 1000 ml con acqua distillata)
- acqua distillata oppure osmotizzata (opzionale: acqua sterile)
- n-eptano (per campioni con un elevato contenuto di grassi)
- Brain-Heart-Infusion (BHI), per il pre-arricchimento di potenziali tossine formate da ceppi di Stafilococchi. Per la fornitura di BHI è necessario rivolgersi al produttore/distributore locale di terreni colturali.

Ulteriori reagenti necessari per il metodo EOSM:

- acido cloridrico (5N e 1N)
- idrossido di sodio (5N e 1N)
- glicole polietilenico 20 000 (PEG), qualità per sintesi

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il kit RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E deve essere eseguito solo da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente.

Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per le note di pericolo sul contenuto delle sostanze si prega di fare riferimento alle schede di sicurezza dei materiali (MSDS) appropriate per questo prodotto, disponibili online all'indirizzo www.r-biopharm.com.

7. Conservazione

Conservare il kit a 2-8°C (35-46°F). **Non congelare alcun componente del kit.**

I pozzetti non utilizzati vanno tenuti con l'agente essiccante nel sacchetto ben chiuso con la zip e conservati a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione rossa di substrato/cromogeno è fotosensibile, di conseguenza evitare l'esposizione alla luce diretta.

Non si applica alcuna garanzia di qualità dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

Il kit può essere utilizzato regolarmente almeno fino alla data di scadenza (indicata sulla confezione del kit), se conservato correttamente.

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a kit con diverso numero di lotto.

8. Indicazioni di instabilità e deterioramento dei reagenti

- Qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno prima dell'esecuzione del test
- Valori inferiori ad 1.0 unità di assorbanza ($A_{450/620\text{nm}} \pm 10\text{nm} < 1.0$) per il controllo positivo

9. Preparazione dei campioni

I campioni devono essere conservati a 5 ± 3 °C (41 ± 5.4 °F) fino all'estrazione. I campioni devono essere completamente scongelati prima della fase di estrazione.

Nota importante: Per una buona precipitazione delle particelle grezze e per una separazione completa delle fasi talvolta potrà rendersi necessario l'aumento della velocità o del tempo di centrifugazione.

Le proteine alimentari possono interagire con le tossine o con gli anticorpi del kit. Tali interazioni possono influire fortemente con la rilevazione delle tossine. Pertanto si raccomanda vivamente di preparare i campioni alimentari secondo *“Il metodo di screening europeo del laboratorio di riferimento europeo per gli Stafilococchi coagulasi-positivi”* (vedi paragrafo 9.5).

Il metodo semplificato per la preparazione dei campioni descritto ai paragrafi da 9.1 a 9.3 non è solitamente adatto per l'estrazione di SET da matrici complesse (esempio pesce, cioccolato, verdura acidificata, sottaceti). Per queste matrici si sono osservati valori di recupero particolarmente bassi nonché legami aspecifici delle proteine del campione con gli anticorpi del test.

Su richiesta è disponibile l'elenco dei valori di recupero per una vasta gamma di diverse matrici alimentari.

9.1. Metodo semplificato per il latte

- centrifugare i campioni di latte (10-25 ml), soprattutto i campioni di latte intero, a freddo: 10 minuti / 3500 g / 10°C (50°F)
(se non si dispone di una centrifuga refrigerata è necessario il pre-raffreddamento dei campioni)
- rimuovere lo strato superiore cremoso assorbendolo generosamente
- nel saggio utilizzare 100 µl per pozzetto

9.2. Metodo semplificato per pasta e riso (cotti), carne, gelati, alimenti processati e altri alimenti con un contenuto di grassi inferiore al 40%

- sminuzzare 10-25 g di campione e omogeneizzarlo con 1.5 ml di PBS (pH 7.4) per g di campione (es. 10 g di campione + 15 ml di tampone)
- agitare per 15 minuti
- centrifugare: 10 minuti / 3500 g / 10°C (50°F)
- se necessario, asportare lo strato superiore grasso
- nel saggio utilizzare 100 µl per pozzetto

9.3. Metodo semplificato per alimenti con un contenuto di grassi maggiore del 40%

- sminuzzare 10-25 g di campione e omogeneizzarlo con 1.5 ml di PBS (pH 7.4) per g di campione (es. 10 g di campione + 15 ml di tampone)
- agitare per 15 minuti
- centrifugare: 10 minuti / 3500 g / 10°C (50°F)
- trasferire il surnatante in una nuova provetta da centrifuga, aggiungere il medesimo volume di n-eptano e agitare vigorosamente per 5 minuti
- centrifugare: 5 minuti / 3500 g / 10°C (50°F)
- rimuovere lo strato superiore di eptano ed evitare di trasferire residui di eptano nei pozzetti
- nel saggio utilizzare 100 µl di fase acquosa per pozzetto

9.4. Colture batteriche

I ceppi di *S. aureus* (così come *S. hyicus* oppure *S. intermedius*) che possono potenzialmente formare tossine devono essere pre-arricchiti in Brain-Heart-Infusion (BHI) per garantire una formazione ottimale di enterotossine.

Nota importante: prima dell'analisi assicurarsi che tutti i ceppi che devono essere analizzati siano presenti nelle colture pure

- centrifugare il surnatante dell'estratto colturale per 5 minuti / almeno a 3500 g /10°C (50°F)
- si raccomanda la filtrazione sterile del surnatante onde evitare che i precipitati o le cellule risospese possano influire la reazione nel test
- nel saggio utilizzare 100 µl di filtrato per pozzetto

Nota: Eventuali effetti di elevato background (valori alti per i controlli negativi) possono essere evitati diluendo ulteriormente il filtrato sterile con tampone PBS.

Questo è valido anche nel caso in cui i valori di OD misurati per la rilevazione di tossine sono fuori dall'intervallo di linearità (circa ≥ 3.0 , si prega di leggere il manuale del produttore).

I campioni pronti per l'analisi e i surnatanti delle colture devono essere conservati a 5 ± 3 °C (41 ± 5.4 °F) se l'analisi non può essere eseguita entro 48h. Per periodi di conservazione maggiori, le soluzioni devono essere congelate a ≤ -18 °C (≤ -0.4 °F).

I campioni preparati o i surnatanti delle colture congelati devono essere completamente scongelati e portati a temperatura ambiente prima dell'analisi. Utilizzare immediatamente i campioni, una volta scongelati, con il test RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E. Tali campioni non possono più essere congelati.

I campioni nonché i surnatanti di colture preparati per l'analisi con il kit RIDASCREEN® SET Total possono essere utilizzati direttamente per l'identificazione della tossina con il kit RIDASCREEN® SET A,B,C,D,E.

9.5 Preparazione del campione secondo il metodo ufficiale di screening europeo, versione 5, settembre 2010

9.5.1 Fase di preparazione prima dell'estrazione delle tossine

Dal momento che le enterotossine stafilococciche possono essere distribuite in modo non omogeneo nel campione, miscelare se possibile l'intero campione o una parte rappresentativa di esso tramite mixer.

Pesare 25 g \pm 0.1 g di campione miscelato e trasferire questa porzione in un beaker.

NOTA 1: In caso di formaggio con crosta, prendere circa il 10% di crosta per il 90% di formaggio

NOTA 2: In caso di campioni in polvere, ricostituire il campione pesando 12,5 g di campione e 12,5 g di acqua distillata o seguire le istruzioni del produttore (es: latte in polvere al 10%).

NOTA 3: In caso di sospetta intossicazione alimentare da stafilococco (SPFO), la dimensione minima del campione per eseguire l'analisi è pari a 12.5g.

9.5.2 Fase di estrazione

Aggiungere 40 mL di acqua distillata calda o osmotizzata (38 ° C \pm 2 ° C/100.4 \pm 7.2 ° F) alla sostanza da analizzare ed omogeneizzare la miscela utilizzando un Turrax, un miscelatore o uno stomacher. Lavare il sistema con acqua distillata.

NOTA 1: In caso di campioni liquidi, non aggiungere 40ml di acqua distillata.

Lasciare che la tossina diffonda agitando il campione a temperatura ambiente per almeno 30 min.

Passaggio di acidificazione: acidificare la miscela con poche gocce di acido cloridrico per ottenere un **pH tra 3.5 e 4.0**

*NOTA 2: Durante l'acidificazione del campione, per mantenere le enterotossine in buono stato, è necessario prestare particolare attenzione a: i) utilizzare il pHmetro e ii) mantenere il **pH tra 3.5 e 4.0** prima delle centrifugazione*

Fare attenzione a non portare il pH ad un valore <3.0 con acido cloridrico. Se il pH diventa <3.0, prendere un'altra porzione di campione da 25 g e procedere come descritto al punto 9.5.1

Centrifugare la miscela per almeno 3130 x g per 15 min a **4°C (32.9°F)** o a **temperatura ambiente**. Trasferire il surnatante in un beaker.

NOTA 3: Non esitare a sciacquare con acqua distillata ad ogni passaggio per recuperare il massimo di tossina.

NOTA 4: Se il surnatante non è abbastanza limpido, centrifugare di nuovo come descritto sopra.

*NOTA 5: Il pH del surnatante dopo la prima centrifugazione deve essere <4.5. Se non è così, acidificare fino ad ottenere un **pH compreso tra 3.5 e 4.0** e centrifugare ancora come descritto sopra.*

Passaggio di neutralizzazione: neutralizzare la miscela utilizzando idrossido di sodio per ottenere un **pH tra 7.4 e 7.6**. Centrifugare di nuovo come descritto sopra. Recuperare l'intera fase acquosa neutralizzata.

*NOTA 6: Durante la neutralizzazione del campione, per mantenere le enterotossine in buono stato, è necessario prestare particolare attenzione a: i) utilizzare il pHmetro e ii) mantenere il **pH tra 7.4 e 7.6** dopo la neutralizzazione.*

Fare attenzione a non superare pH di 9.0. Se il pH è > 9.0, prendere un'altra porzione di campione da 25 g e procedere come descritto al punto 9.5.1

9.5.3 Passaggio di concentrazione dialisi

Per ogni campione:

- Preparare la soluzione PEG 30% (w/v) (30 g PEG/ 100 ml di acqua distillata)
- Tagliare circa 50-60 cm di membrana per dialisi
- Immergere la membrana in acqua distillata seguendo le istruzioni del produttore (a temperatura ambiente per almeno 30 minuti).
- Risciacquare la membrana con acqua distillata (dentro e fuori).
- Bloccare un'estremità della membrana con una chiusura, riempire con la fase acquosa neutralizzata preparata secondo il paragrafo 9.5.2 utilizzando un imbuto ed un piccolo pezzo di lana di vetro per eliminare le particelle sospese.
- Bloccare l'altra estremità della membrana con una seconda chiusura.

NOTA 1: Se il campione da analizzare è molto salato o molto dolce, effettuare una dialisi mediante agitazione con 2 litri di acqua distillata, due volte in un'ora.

- Stendere la membrana di dialisi riempita in un recipiente contenente la soluzione PEG al 30% (w / v).
- Lasciare che gli estratti si concentrino per tutta la notte a 5 ± 3 ° C (41 ± 5.4 ° F).

NOTA 2: Se l'estratto non è concentrato a sufficienza, lasciarlo nella soluzione PEG per più tempo o aggiungere un po' di polvere di PEG.

- Prelevare la membrana di dialisi dalla soluzione PEG e risciacquare la parte esterna della membrana con acqua distillata per rimuovere tutte le tracce di PEG.

Recuperare l'estratto concentrato con:

- **Soluzione PBS se l'estratto contiene latte o prodotti a base di latte**
- **Acqua osmotizzata se l'estratto non contiene latte o prodotti a base di latte**

Risciacquare bene la parte interna della membrana di dialisi per ottenere una massa finale di estratto concentrato che va da 5.0 g a 5.5 g (massimo 5.8 g per gli estratti appiccicosi).

Durante questa fase, si raccomanda:

- di strofinare le parti interne della membrana di dialisi (una contro l'altra) con le dita al fine di estrarre e recuperare il massimo delle enterotossine.
- Versare piccole gocce di soluzione salina o acqua osmotizzata (mediante diverse aggiunte) e sciacquare più volte la membrana interna al fine di recuperare tutte le enterotossine.

Trasferire accuratamente l'estratto concentrato in un flaconcino di vetro.

NOTA 3: Se il peso iniziale del campione da testare è inferiore a 25 g (9.5.1, nota 3, in caso di SFPO), aver cura di ottenere un rapporto finale pari a 5 tra il peso dell'estratto concentrato ed il peso del campione.

In caso di SFPO la porzione di massa da analizzare può differire da 25 g. Il rapporto tra massa di sostanza da analizzare e l'estratto concentrato è mostrato nella seguente tabella:

Porzione di massa	Estratto concentrato
17.5 g – 25.0 g	3.5 g – 5.0 g (rapporto 5:1)
12.5 g to 17.5 g	3.5 g (3.9 g max.)

NOTA 4: Se gli estratti concentrati sono analizzati entro 48h, conservarli a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ($41 \pm 5.4^{\circ}\text{F}$) altrimenti conservarli a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ($\leq -0.4^{\circ}\text{F}$). Gli estratti devono essere completamente scongelati ed omogeneizzati prima dell'analisi.

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ / $68\text{-}77^{\circ}\text{F}$) prima dell'uso.

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 10 volte. Prima dell'uso, diluirlo 1:10 (1+9) con acqua distillata (ad es. 10 ml di concentrato + 90 ml di acqua distillata). In caso di presenza di cristalli nel tampone concentrato dissolverli prima dell'uso riscaldando il tampone a 37°C (99°F). Il tampone di lavaggio diluito ha una scadenza di circa 4 settimane se conservato a $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ ($35\text{-}46^{\circ}\text{F}$).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozzetti tra i vari passaggi del test.

1. Inserire un numero sufficiente di strip nel supporto per tutti i campioni da eseguire. Per ogni campione sono necessari tutti i pozzetti di una strip.
2. Pipettare 100 µl di campione nei pozzetti A – G di una microstrip, nel pozzetto H pipettare 100 µl di controllo positivo. Miscelare manualmente la piastra, coprirla ed incubare per 1 ora a 35-37°C (95-98.6°F).
3. Svuotare completamente i pozzetti in un lavandino. Rovesciare la piastra su un foglio di carta assorbente picchiettandola (per tre volte di fila) in modo da eliminare tutto il liquido in essi contenuto. Con una micropipetta multicanale riempire i pozzetti con 300 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 10.1.) ed eliminare poi nuovamente il liquido. Svuotare i pozzetti come descritto sopra eliminando ancora una volta tutto il liquido. Ripetere la procedura di lavaggio altre 4 volte.
4. Pipettare 100 µl di coniugato 1 in ogni pozzetto. Miscelare manualmente la piastra, coprirla ed incubare per 1 ora a 35-37°C (95-98.6°F).
5. Svuotare completamente i pozzetti in un lavandino. Rovesciare la piastra su un foglio di carta assorbente picchiettandola (per tre volte di fila) in modo da eliminare tutto il liquido in essi contenuto. Con una micropipetta multicanale riempire i pozzetti con 300 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 10.1.) ed eliminare poi nuovamente il liquido. Svuotare i pozzetti come descritto sopra eliminando ancora una volta tutto il liquido. Ripetere la procedura di lavaggio altre 4 volte.
6. In ogni pozzetto pipettare 100 µl di coniugato 2. Miscelare manualmente la piastra, coprirla ed incubare per 30 minuti a 35-37°C (95-98.6°F).
7. Svuotare completamente i pozzetti in un lavandino. Rovesciare la piastra su un foglio di carta assorbente picchiettandola (per tre volte di fila) in modo da eliminare tutto il liquido in essi contenuto. Con una micropipetta multicanale riempire i pozzetti con 300 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) ed eliminare poi nuovamente il liquido. Svuotare i pozzetti come descritto sopra eliminando ancora una volta tutto il liquido. Ripetere la procedura di lavaggio altre 4 volte.
8. Aggiungere 100 µl di substato/cromogeno per ciascun pozzetto. Miscelare manualmente la piastra, coprirla ed incubare per 15 minuti a 35-37°C (95-98.6°F).

9. Pipettare 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare manualmente la piastra e leggere le assorbanze a 450/620 ± 10 nm. Leggere entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop

11. Risultati

Per l'interpretazione dei risultati è disponibile uno specifico software denominato RIDA[®]SOFT Win (Art. No. Z9996) sviluppato per i kit immunoenzimatici della linea RIDASCREEN[®] da R-Biopharm

11.1. Controllo di qualità del test (intervalli validi per i controlli)

1. I valori di assorbanza del controllo positivo devono essere uguali o maggiori ad 1.0
2. La media dei valori di assorbanza dei controlli negativi nei pozzetti deve essere uguale o minore a 0.2 unità.

Nel caso in cui tali criteri non fossero rispettati, verificare i seguenti passaggi e correggerli prima di ripetere il test:

- Verificare la data di scadenza
- Assicurarci che i singoli componenti del kit siano stati mantenuti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) per un periodo sufficiente.
- Un nuovo puntale deve essere utilizzato per ogni campione o controllo per evitare cross-contaminazioni
- Verificare il tampone di lavaggio per possibili contaminazioni (possibilmente utilizzare acqua sterile per la preparazione)
- Lavaggio dei pozzetti inadeguato/inferiore rispetto a quanto raccomandato (vedi paragrafo 10.2)
- Pipette contaminate (pulirle regolarmente)

11.2. Determinazione del valore di cut-off

Il valore medio di assorbanza del controllo negativo nei pozzetti F e G va determinato separatamente per ogni campione. Calcolare il cut-off aggiungendo 0.15 al valore medio del controllo negativo.

Esempio: Controllo negativo 1 (pozzetto F) = 0.008
 Controllo negativo 2 (pozzetto G) = 0.010

Valore medio = 0.009

Valore di cut-off = 0.009 + 0.15 = 0.159

11.3. Interpretazione dei risultati

1. I campioni che risultano validi (11.1) e che alla lunghezza d'onda di 450/620 \pm 10 nm hanno un'assorbanza uguale o maggiore al valore di cut-off sono da considerarsi POSITIVI
2. I campioni che risultano validi (11.1) e che alla lunghezza d'onda di 450/620 \pm 10 nm raggiungono un'assorbanza inferiore a quella del cut-off sono da considerarsi NEGATIVI.

12. Cross-reattività degli anticorpi

Si sono rilevate cross-reattività tra anticorpo/tossina: A/E, E/A, B/C e C/B. La percentuale di cross-reattività è compresa tra 10 - 50 %. Alcune matrici alimentari (ad esempio latte, salumi) possono aumentare o indebolire la cross-reattività. Se si sospettano cross-reattività, si raccomanda di diluire i campioni preparati con il tampone PBS (vedi sotto) e misurare nuovamente.

Per distinguere in modo significativo tra la cross-reattività e la rilevazione attuale, i valori di assorbanza delle misurazioni positive di tossina dovrebbero essere compresi tra 1.0 ed un massimo di 2.5. Per campioni positivi con valori di estinzione superiori a 2.5 il campione dovrebbe essere diluito, così che il segnale specifico sia nell'intervallo da 1.0 a 2.5.

Esempio 1 di crossreattività tra A / E:

A) Risultati del campione iniziale:

Valore di estinzione per il rilevamento della tossina A: 4.1

Valore di estinzione per il rilevamento della tossina E: 3.6

B) Il campione deve essere diluito per ottenere un valore di estinzione nell'intervallo tra 1,0 e 2,5:

Valore di estinzione per il rilevamento della tossina A: 2.5

Valore di estinzione per il rilevamento della tossina E: **1.0**

Spiegazione: Il segnale del campione nella cavità della tossina E è 1.0 e dovrebbe essere valutato come molto positivo. Ma è solo il 40% del segnale specifico del campione nella cavità A. Ciò deve essere valutato come crossreattività. Il campione contiene solo tossina A.

Esempio 2 per assenza di crossreattività tra A / E:

A) Risultati del campione iniziale:

Valore di estinzione per il rilevamento della tossina A: 4.1

Valore di estinzione per il rilevamento della tossina E: 3.6

B) Il campione deve essere diluito per ottenere un valore di estinzione nell'intervallo tra 1,0 e 2,5:

Valore di estinzione per il rilevamento della tossina A: 2.5

Valore di estinzione per il rilevamento della tossina E: **1.9**

La differenza principale tra l'esempio 1 e l'esempio 2 è il valore di estinzione del campione nella cavità E (1.9), che è chiaramente superiore al 50% del segnale specifico del campione nella cavità A. In conclusione, non c'è cross-reattività. Il campione contiene tossina A e tossina E.

I dati corrispondono al nostro attuale stato di tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti e sui loro usi. R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.

R-Biopharm AG

indirizzo:

An der neuen Bergstraße 17

64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: info@r-biopharm.de

www.r-biopharm.com