

r-biopharm®



RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A

Art. N. R5402

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo di ocratossina A

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

Prodotto da:

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

Per informazioni:

Telefono:

Centralino (0 61 51) 81 02-0

Telefax / E-Mail:

Ordini (0 61 51) 81 02-20
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®FAST Ochratoxin A

Introduzione

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A (Cod. RS5402) è un test immunoenzimatico competitivo per il dosaggio dell'ocratossina A in mais, frumento, orzo, avena (cereale) e mangimi.

Tutti i reagenti necessari per l'esecuzione dell'analisi immunoenzimatica compresi gli standard sono contenuti nel kit.

Ogni kit contiene il necessario (compresi gli standard) per eseguire 48 determinazioni. Per l'analisi quantitativa è necessario un lettore per micropiastre.

Si prega di notare che per l'interpretazione dei risultati è necessario utilizzare il seguente metodo: Ridawin.NET \ FOOD \ Mycotoxins FAST \ R5402 FAST Ochratoxin A ECO.met.

Preparazione campioni: estrazione, centrifugazione e diluizione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni)
mais, frumento, orzo, avena..... ca. 20 min
mangimi ca. 20 min
esecuzione del test (tempo d'incubazione).....8 min

Limite di rilevabilità: mais..... 1.3 µg/kg (ppb)
frumento.....1.5 µg/kg (ppb)
orzo1.5 µg/kg (ppb)
avena..... 2.0 µg/kg (ppb)
mangimi.....2.8 µg/kg (ppb)

Valori di recupero: mais 100 +/- 30 %
(campioni naturalmente frumento..... 100 +/- 30 %
contaminati - TRILOGY®) mangimi..... 80 -130 %

Valori di recupero: mais (FAPAS) 60 - 130 %
(campioni arricchiti) frumento (FAPAS) 60 - 100 %
orzo (FAPAS)60 - 100 %
avena (cereale) 60 - 130 %
mangimi (FAPAS) 100 +/- 30 %

Nota: Il saggio è stato verificato utilizzando campioni naturalmente contaminati. Possono esserci variazioni nei valori di recupero di campioni arricchiti.

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) – Manual, 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 www.rbiopharm.com/products/food-feed-analysis .

Prodotti correlati

RIDASCREEN® Ochratoxin A (R1312)

RIDA® Ochratoxin A column (R1303)

TRILOGY® Certified Liquid Standard Ochratoxin A (CTSL-520-5)

TRILOGY® Liquid Standard Ochratoxin A (TSL-504-5)

TRILOGY® Dried Standard Ochratoxin A (TS-503-5)

1. Scopo

RIDASCREEN®FAST Ochratoxin A è un test immunoenzimatico competitivo per il dosaggio dell'ocratossina A in mais, frumento, orzo, avena (cereale) e mangimi.

2. Generale

L'ocratossina A è una micotossina prodotta dai funghi dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Oltre ad una marcata nefrotossicità, l'ocratossina A mostra attività epatotossica, teratogena, carcinogena ed immunosoppressiva.

Il rischio per la salute dell'uomo deriva non solo dall'assunzione di alimenti vegetali contaminati ma anche dall'uso di alimenti di origine animale. L'ocratossina A è stata rilevata nel sangue e nel rene dei suini, ed anche nel sangue umano e nel latte materno.

3. Principio del test

La base del test è una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono sensibilizzati con anticorpi di cattura specifici per gli anticorpi anti-ocratossina A. Nei pozzetti si aggiungono gli standard di ocratossina A o le soluzioni campione e l'enzima coniugato. L'ocratossina A libera e quella coniugata all'enzima competono per legarsi ai siti di legame dell'anticorpo (saggio immunoenzimatico competitivo). Il coniugato non legato viene quindi eliminato con una fase di lavaggio. La soluzione di substrato/cromogeno è aggiunta nei pozzetti

e lasciata incubare. Il coniugato legato trasforma il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop provoca un viraggio del colore da blu a giallo. La determinazione quantitativa viene eseguita con un lettore di micropiastre a 450 nm. Il valore di assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di ocratossina A nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene il materiale necessario per 42 analisi (a cui si aggiungono le 6 analisi degli standard). Ogni kit contiene:

Componente	Colore tappo	Formato		Quantità
Micropiastra	-	Pronto all'uso		48 pozzetti
ECO extractor	Trasparente	Concentrato 10 x		2 x 120 ml
Standard 1*	Bianco	Pronto all'uso	0 µg/L	1.3 ml
Standard 2*	Bianco	Pronto all'uso	1 µg/L	1.3 ml
Standard 3*	Bianco	Pronto all'uso	3 µg/L	1.3 ml
Standard 4*	Bianco	Pronto all'uso	10 µg/L	1.3 ml
Standard 5*	Bianco	Pronto all'uso	30 µg/L	1.3 ml
Standard 6*	Bianco	Pronto all'uso	100 µg/L	1.3 ml
Wash buffer salt Tween**		Sali da sciogliere		
Conjugate	Rosso	Pronto all'uso		3 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Stop solution	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

*) Il fattore di diluizione 10 per il campione è già stato considerato. Le concentrazioni di ocratossina A (µg/kg oppure µg/L) nel campione possono essere quindi lette direttamente sulla curva standard.

***) Il tampone di lavaggio pronto all'uso (vedi preparazione paragrafo 10.1) deve essere utilizzato come tampone per i campioni e per il lavaggio.

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- trituratore o macinino da laboratorio
- cilindro graduato (plastica o vetro) 100 ml
- centrifuga ($\geq 3,500$ g)
- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- shaker (opzionale)
- miscelatore Vortex
- micropipette a volume variabile da 50 μ l - 100 μ l e 1000 μ l

5.2. Reagenti:

- acqua distillata o deionizzata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Il test deve essere eseguito solo da personale di laboratorio esperto, seguendo attentamente le istruzioni per l'uso fornite.

Gli standard contengono ocratossina A: maneggiarli con attenzione. Utilizzare i guanti per evitare il contatto dei reagenti con la cute.

La decontaminazione della vetreria e delle soluzioni contenenti ocratossina A deve essere eseguita con una soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina) (10% v/v) per una notte (portare il pH della soluzione a 7 con l'aggiunta di HCl).

Il kit può contenere sostanze pericolose. Per ulteriori informazioni sulla sostanze contenute, far riferimento alla scheda di sicurezza (MSDS) scaricabile direttamente online al sito www.r-biopharm.com

7. Conservazione

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

Riporre i pozzetti non utilizzati nella custodia originale, richiudere con il dissecante in dotazione e conservare a 2-8°C (35-46°F).

La soluzione substrato/cromogeno, di colore rossastro, è fotosensibile: evitare di esporla alla luce diretta.

La garanzia di qualità del prodotto decade alla data di scadenza riportata in etichetta.

Il kit può essere utilizzato normalmente almeno fino alla data di scadenza riportata in etichetta, se adeguatamente conservato.

Non scambiare singoli reagenti di kit appartenenti a lotti diversi.

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- qualsiasi colorazione bluastra del cromogeno rosso, prima dell'esecuzione del test
- un valore di assorbanza inferiore a 0.8 ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) relativo allo standard zero

9. Preparazione dei campioni

I campioni devono essere conservati in un luogo fresco e protetto dalla luce.

9.1 Tampone di estrazione

Per l'estrazione, è necessario utilizzare la ECO Extractor diluita. Per ottenere la soluzione di estrazione ECO pronta all'uso, diluire la ECO Extractor (concentrata 10 x) 1:10 con acqua distillata o deionizzata. La ECO Extractor diluita è stabile per una settimana a 2-8 °C (36-46 °F). Se la ECO Extractor diluita dovesse risultare torbida (a causa di una possibile contaminazione), eliminarla e non utilizzarla per per il saggio.

9.2 Estrazione di mais, frumento, orzo, avena (cereale) e mangimi

Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (20-25°C/ 68-77°F) prima dell'uso ed eseguire la preparazione del campione a temperatura ambiente.

Macinare finemente un campione rappresentativo (raccolto secondo le comuni tecniche di campionamento) e miscelarlo prima di procedere all'estrazione (dimensioni raccomandate per le particelle: 500 µm).

Si raccomanda di preparare una replica aggiuntiva per i campioni non noti.

- pesare 10 g di campione macinato ed omogeneizzato in un opportuno contenitore (ad esempio bottiglia da 125 ml) ed aggiungere 50 ml di ECO Extractor diluita
- agitare bene tramite vortex (10 secondi)

- miscelare vigorosamente per 5 minuti (manualmente o con shaker a 420 rpm)
- centrifugare per 5 minuti a 3.500 g e a temperatura ambiente (20-25°C/ 68-77°F)
- diluire 1 ml del surnatante con 1 ml di tampone di lavaggio pronto all'uso (tampone per il campione, vedi paragrafo 10.1).
- utilizzare 50 µl del surnatante diluito per pozzetto

Nota: per i campioni che risultano fuori dall'intervallo di misurazione ovvero > 100 µg/kg (ppb) si consiglia eseguire una ulteriore diluizione 1:10 o al massimo 1:20 con il tampone di lavaggio pronto all'uso (vedi 10.1.). Il fattore di diluizione risultante di 10 (diluizione 1:10) o 20 (diluizione 1:20) deve essere tenuto in considerazione nel calcolo (cioè i risultati devono essere moltiplicati rispettivamente per 10 o 20).

10. Esecuzione del test

10.1. Indicazioni preliminari

1. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) prima dell'uso ed eseguire il test a temperatura ambiente.
2. Riportare tutti i reagenti a 2-8°C (35-46°F) immediatamente dopo il loro utilizzo.

Come **tampone di lavaggio** e tampone per i campioni è necessario utilizzare un tampone PBS tween. Si prega di utilizzare i sali contenuti nel kit (vedi paragrafo 4). Disciogliere l'intero contenuto della bustina di sali in un litro di acqua distillata. Il tampone pronto all'uso scada dopo circa 4-6 settimane se conservato a 2-8 °C (36-46°F).

In alternativa: disciogliere il contenuto della bustina in 100 ml di acqua distillata per ottenere un tampone concentrato 10x. Il tampone 10x scade dopo circa 8-12 settimane se conservato a temperatura ambiente (20-25 °C/ 68-77 °F).

10.2. Procedura per l'esecuzione del test

È fondamentale eseguire attentamente la procedura di lavaggio. Evitare che i pozzetti della micropiastra si asciughino completamente ed evitare intervalli protratti tra i vari passaggi del test. Ciò significa che il protocollo deve essere eseguito velocemente. La riproducibilità dei saggi immunoenzimatici dipende in larga misura dall'accuratezza con cui vengono lavati i pozzetti, pertanto seguire scrupolosamente la procedura di lavaggio raccomandata. Non utilizzare più di 3 strip alla volta.

Evitare di esporre i pozzetti a luce diretta durante i periodi di incubazione. A tal fine si raccomanda di coprire la micropiastra.

1. Inserire nel supporto un numero di pozzetti sufficiente per l'analisi sia degli standard che dei campioni e registrare le rispettive posizioni.
2. Pipettare 50 µl di soluzione standard o di campione in ogni pozzetto utilizzando un nuovo puntale per ogni soluzione standard e per ogni campione.
3. Aggiungere 50 µl di coniugato in ciascun pozzetto. Agitare delicatamente facendo oscillare la micropiastra manualmente e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) e al buio.
4. Svuotare i pozzetti picchiettando la piastra capovolta su carta assorbente (per tre volte) per eliminare ogni residuo di liquido. Riempire i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi paragrafo 10.1) ed eliminare nuovamente il liquido. Ripetere la procedura altre due volte.
5. Aggiungere 100 µl di soluzione substrato/cromogeno ad ogni pozzetto. Agitare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 3 minuti a temperatura ambiente (20-25°C/68-77°F) e al buio.
6. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e misurare l'assorbanza a 450 nm. Leggere i risultati entro 15 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Per i saggi immunoenzimatici RIDASCREEN®, R-Biopharm ha elaborato un apposito software di valutazione, denominato RIDA®SOFT Win.NET (cod. Z9996).

Si prega di notare che per l'interpretazione dei risultati è necessario utilizzare il seguente metodo: Ridawin.NET \ FOOD \ Mycotoxins FAST \ R5402 FAST Ochratoxin A ECO.met

La valutazione è eseguita con logit/log.

Il profilo della curva standard è riportato nel Certificato di Assicurazione della Qualità incluso nel kit.

Nota per il calcolo senza l'uso del software:

$$\frac{\text{Assorbanza dello standard (o campione)}}{\text{Assorbanza standard 0}} \times 100 = \% \text{ assorbimento}$$

Lo standard zero è così uguale al 100% e i valori di assorbanza sono calcolati in percentuale. Inserire i valori calcolati per gli standard in un sistema di coordinate su scala semilogaritmica contro le concentrazioni di ocratossina A espresse in µg/kg.

Leggere quindi la concentrazione di ocratossina A in µg/kg corrispondente all'estinzione di ogni campione, sulla curva di calibrazione.

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.