

RIDASCREEN[®] Risk Material

Saggio immunoenzimatico per l'analisi quantitativa di
materiale a rischio (SNC)
nelle carni lavorate e negli insaccati

Cod. R6701

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

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 dell'Artigianato 19
20070 Cerro al Lambro 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[®] Risk Material

Introduzione

RIDASCREEN[®] Risk Material (Cod. R6701) è un saggio immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa di materiale a rischio (SNC) nelle carni e negli insaccati trattati termicamente.

Tutti i reagenti richiesti per l'analisi immunoenzimatica – compresi gli standard – sono contenuti nel kit.

Il kit è sufficiente per 96 determinazioni (inclusi gli standard).

Per la quantificazione è richiesto uno spettrofotometro per micropiastre.

Per l'esecuzione di RIDASCREEN[®] Risk Material non è necessario un corso specialistico, tuttavia su richiesta è possibile avere un supporto gratuito da parte dei distributori del prodotto.

Preparazione dei campione: omogeneizzazione, estrazione, centrifugazione e diluizione

Tempo richiesto: preparazione dei campioni (10 campioni)..ca. 1 h
esecuzione del test (tempo d'incubazione)1 h

Limite di rilevabilità: ≤ 0.2 % per il tessuto del SNC
di carni e insaccati trattati termicamente

Specificità: RIDASCREEN[®] Risk material permette la rilevazione del tessuto del SNC in campioni di carni di manzo, vitello, pecora, capra, cavallo, pollo e suino.
Non consente invece l'identificazione del tessuto specifico (cervello, midollo spinale o occhio).

Nota: Per l'analisi del materiale di rischio (SNC) di carni crude, derivati della carne o superfici contaminate si fa riferimento al test RIDASCREEN[®] Risk Material 10/5, Cod. R6703.

1. Scopo

RIDASCREEN® Risk Material è un saggio immunoenzimatico a sandwich per l'analisi quantitativa del materiale a rischio (SNC) nelle carni e negli insaccati trattati termicamente.

2. Generale

La BSE (encefalopatia bovina spongiforme) è stata diagnosticata per la prima volta in Gran Bretagna nel 1986. I meccanismi molecolari dell'infezione sono ancora oscuri, mentre è accertato che la proteina prionica (prPsc) svolge un ruolo determinante nella trasmissione e nello sviluppo della malattia cerebrale. Causa principale della diffusione della BSE sembra essere il consumo di mangimi animali a base di carni lavorate a temperature insufficienti. A fine 2000 erano 180000 le vacche uccise dalla BSE. Il consumo di estratti del tessuto cerebrale infetto ha causato l'infezione di specie animali differenti. Attualmente si documentano patologie simili in vacche, pecore, capre, gatti e molti altri mammiferi. L'ipotesi tuttora al vaglio è che la causa della nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD) sia il consumo di carne bovina infetta e dei suoi derivati. Il tasso di mortalità è del 100%, con 111 decessi in Gran Bretagna a fine maggio 2002. Come misura precauzionale non è più consentito l'utilizzo di mangimi animali o di proteine animali nei mangimi (direttiva 2000/766/EG) e il materiale a potenziale rischio è stato bandito dalla produzione alimentare dalla EU (2000/418/EG) / (2001/999/EG).

3. Principio del test

Alla base del test vi è una reazione antigene-anticorpo. La rilevazione del materiale a rischio si ottiene con la quantificazione della Proteina Acida Glio Fibrillare (GFAP), un marcatore cellulare che si può trovare ad altissime concentrazioni nel tessuto del SNC. I pozzetti della micropiastra sono sensibilizzati con anticorpi specifici diretti contro la proteina GFAP. Se il campione è contaminato con tessuto del SNC, le proteine acide glio fibrillari in esso contenute si legano agli specifici anticorpi di cattura. La proteina GFAP legata viene rilevata dall'anticorpo coniugato con perossidasi diretto contro la proteina GFAP (enzima coniugato). L'enzima coniugato non legato viene poi eliminato con un lavaggio. Quando nei pozzetti viene aggiunta la soluzione substrato/cromogeno, l'enzima coniugato converte il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta della soluzione di stop porta a un viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione viene eseguita fotometricamente a 450 nm. L'assorbanza è proporzionale alla concentrazione del materiale a rischio contenuto nel campione.

4. Reagenti forniti

Ciascun kit contiene materiale sufficiente per 96 misurazioni (incluse le analisi degli standard). Ogni kit contiene:

- 1 x Micropiastra (12 strip da 8 pozzetti ciascuna)
sensibilizzata con anticorpi contro la proteina GFAP
- 4 x Soluzioni standard (1.3 ml ciascuna)
di GFAP in soluzione acquosa
corrispondenti a 0 % (standard zero), 0.2 %, 1.0 %, 2.0 % di materiale a rischio (SNC) nel campione
pronte all'uso
- 1 x Coniugato (6 ml)..... tappo rosso
anticorpo anti GFAP coniugato con perossidasi
pronto all'uso
- 1 x Soluzione substrato/cromogeno (10 ml)..... tappo marrone
colore rosso, contiene tetrametilbenzidina
- 1 x Soluzione di stop (14 ml)..... tappo giallo
contiene acido solforico 1 N
- 1 x Tampone di diluizione del campione (10 ml)..... tappo bianco
concentrato 10 volte
contiene SDS allo 0.5 %
- 1 x Tampone di estrazione (100 ml)
concentrato 10 volte
contiene SDS al 10 %
- 1 x Tampone di lavaggio (sale)
per la preparazione di un tampone fosfato 10 mM a pH 7.4
contiene Tween 20 allo 0.05 %

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- centrifuga + fiale in vetro per centrifuga
- miscelatore, mortaio o omogeneizzatore
- bagno termostatico a 100 °C (212 °F)
- pipette graduate
- micropipette a volume variabile da 20 µl - 200 µl e da 200 - 1000 µl

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

La soluzione di stop contiene acido solforico 1 N (R36/38, S2-26).

Il tampone di estrazione e il tampone di diluizione del campione contengono SDS. Evitare che entrino in contatto con occhi, cute e indumenti.

7. Istruzioni per la conservazione

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

Riporre i pozzetti non utilizzati nella loro busta originale, richiuderli insieme all'essiccante fornito e conservarli a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

La soluzione substrato/cromogeno è fotosensibile, pertanto evitare di esporla alla luce diretta.

La garanzia di qualità decade alla data di scadenza riportata sulla confezione.

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

8. Indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

- qualsiasi colorazione bluastra della soluzione substrato/cromogeno normalmente rossa, prima dell'esecuzione del test
- un valore inferiore a 0.8 unità di assorbanza ($A_{450\text{ nm}} < 0.8$) per lo standard 4 (2.0%)

9. Preparazione dei campioni

9.1. Carni e loro derivati

Nota:

La preparazione dei campioni riveste un ruolo essenziale per il rilascio della proteina GFAP, pertanto deve essere eseguita con la massima accuratezza.

- triturare e omogeneizzare il campione, ad es. con un miscelatore
- miscelare 2 g del campione omogeneizzato con 10 ml di tampone di estrazione diluito (vedi 10.1.) in una fiala in vetro per centrifuga e agitare energicamente per la formazione della sospensione (vortexando)
- riscaldare il campione per 15 minuti a 100 °C (212 °F)
- raffreddare il campione e centrifugare per 10 minuti a 3500 g e a 10 °C (50 °F)

- asportare completamente lo strato di grasso superiore (ad esempio con una pipetta pasteur)
- diluire il surnatante sgrassato 1:20 (1+19) con il tampone di diluizione del campione diluito (vedi 10.1.), ad es. 50 µl di surnatante + 950 µl di tampone diluito
- nel saggio utilizzare 50 µl per pozzetto

Conservazione dei campioni:

Una volta diluiti nel tampone di diluizione del campione, i surnatanti estratti si conservano a 2 - 8 °C (35 - 46 °F) per ca. 8 settimane. Portare i campioni a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) e miscelare brevemente prima dell'uso.

10. Esecuzione del saggio

10.1. Indicazioni preliminari

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) prima dell'uso.

Il **tampone di estrazione** è fornito concentrato 10 volte. Prima di impiegarlo nel saggio, diluirlo 1:10 (1+9) in acqua distillata. Disciogliere i cristalli del tampone concentrato con un bagno termostatico a 37 °C (98 °F). Si raccomanda di effettuare la diluizione del tampone concentrato in un'unica soluzione (ovvero 100 ml di concentrato + 900 ml di acqua distillata).

Il tampone diluito resta stabile almeno fino alla data di scadenza del prodotto, riportata in etichetta. Per evitare che cristallizzi nuovamente, conservarlo a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).

Il **tampone di diluizione del campione** è fornito concentrato 10 volte. Prima dell'uso deve essere diluito 1:10 (1+9) con acqua distillata. Disciogliere i cristalli del tampone concentrato in un bagno termostatico a 37 °C (98 °F). Si raccomanda di diluire il tampone concentrato in un'unica soluzione (ovvero 10 ml di concentrato + 90 ml di acqua distillata).

Il tampone diluito resta stabile fino alla data di scadenza del prodotto riportata in etichetta se conservato a 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

Come **tampone di lavaggio** è necessario un tampone PBS/ Tween. Utilizzare la busta col sale di lavaggio contenuta nel kit (vedi 4.) e discioglierne l'intero contenuto in un litro di acqua distillata. Il tampone di lavaggio pronto all'uso scade dopo ca. 4-6 settimane se conservato a 2 - 8 °C (36 - 46 °F).

In alternativa: Disciogliere il contenuto della busta in soli 100 ml di acqua distillata per ottenere un tampone di lavaggio concentrato 10 volte. Questa soluzione scade dopo ca. 8 - 12 settimane se conservata a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F). Utilizzarne una parte e discioglierla in 9 parti di acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso.

10.2. Procedura del test

Eseguire attentamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare che i pozzetti si asciughino tra un passaggio e l'altro del test

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni da analizzare. Registrarne le rispettive posizioni.
2. Pipettare 50 µl di soluzione standard o di campione preparato nei pozzetti corrispondenti.
3. Aggiungere sul fondo di ciascun pozzetto 50 µl di enzima coniugato (tappo rosso). Miscelare delicatamente facendo oscillare la micropiastra manualmente e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
4. Svuotare i pozzetti, rovesciare la micropiastra su un foglio di carta assorbente e picchiettarla energicamente per eliminare tutto il liquido dai pozzetti. Ripetere per tre volte. Riempire i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi 10.1.) e svuotarli nuovamente. Ripetere l'intera procedura altre due volte.
5. Aggiungere in ciascun pozzetto 100 µl di soluzione substrato/cromogeno (tappo marrone). Miscelare delicatamente facendo oscillare la micropiastra manualmente e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C, 68 - 77 °F) e al buio.
6. Aggiungere in ciascun pozzetto 100 µl di soluzione di stop (tappo giallo). Miscelare delicatamente facendo oscillare la micropiastra manualmente e leggere le assorbanze a 450 nm, entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Il colore ottenuto per gli standard serve da valore di riferimento.

Per la valutazione delle analisi immunoenzimatiche RIDASCREEN® è disponibile un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win (Cod. Z9999), che consente il

reperimento automatizzato dei dati dal lettore e il calcolo dei risultati mediante regressione lineare.

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

Valutazione grafica:

I valori relativi all'assorbanza degli standard sono riportati su un sistema di coordinate contro il contenuto di materiale a rischio espresso in percentuale. I valori relativi agli standard sono collegati con una linea e la concentrazione del materiale a rischio, espressa in %, dipendente dall'assorbanza di ciascun campione può essere letta sulla curva di calibrazione.

Nota:

Il limite di rilevabilità di RIDASCREEN® Risk Material è ≤ 0.2 % per il tessuto del SNC nelle carni e negli insaccati lavorati (termotrattati). Il limite di quantificazione del kit RIDASCREEN® Risk Material è ≤ 0.4 % per il tessuto del SNC nelle carni e negli insaccati lavorati (termotrattati). Nell'interpretazione dei risultati occorre tenere presente che il contenuto in proteine marcatore nei diversi materiali a rischio (cervello, midollo spinale, occhio) può variare. Per questo motivo, il midollo spinale darà risultati positivi anche a basse concentrazioni.

Per il loro contenuto in proteine marcatore native, anche i campioni contenenti carni crude possono risultare positivi a basse concentrazioni.

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.