

RIDASCREEN[®] FAST Citrinin

Art. Nr. R6302

Test immunoenzimatico per l'analisi quantitativa di citrinina

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.

1. Scopo

RIDASCREEN®FAST Citrinin è un saggio immunoenzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di citrinina in campioni di cereali e di mangimi.

2. Generale

La Citrinina è una micotossina prodotta da muffe delle specie *Aspergillus*, *Penicillium* e *Monascus*. Queste sono in grado di produrre la citrinina e/o l'ocratossina A, pertanto le due micotossine sono spesso compresenti.

La citrinina è stata descritta per la prima volta nel 1953 da studiosi giapponesi, i quali la individuarono in campioni di riso di colore giallo, che risultarono contaminati da *Penicillium citrinum*.

La citrinina contamina cereali come il frumento, l'orzo, la segale, l'avena, il mais e il riso e ha gli stessi effetti nefrotossici dell'ocratossina A.

Il tenore di umidità dei cereali è molto importante per lo sviluppo e la crescita delle muffe che producono la citrinina, la quale necessita di livelli minimi compresi tra 16.5 e 19.5%.

3. Principio del test

Il test si basa su una reazione antigene-anticorpo. I pozzetti della micropiastra sono sensibilizzati con citrinina. Vengono aggiunti gli standard, rispettivamente la soluzione campione e gli anticorpi anti-citrinina. La citrinina libera e la citrinina immobilizzata competono per i siti di legame dell'anticorpo (saggio immunoenzimatico competitivo). Dopo il lavaggio vengono aggiunti gli anticorpi secondari marcati con perossidasi, i quali si legano agli anticorpi anti-citrinina legati. Gli anticorpi secondari coniugati all'enzima non legati vengono poi eliminati con un lavaggio. Nei pozzetti viene aggiunta la soluzione substrato/cromogeno e l'enzima coniugato legato (gli anticorpi secondari marcati con perossidasi) converte il colore rosso del cromogeno in blu. L'aggiunta della soluzione di stop provoca il viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione è eseguita fotometricamente a 450 nm. L'assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di citrinina del campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 43 analisi (più le 5 analisi degli standard). Ciascun kit contiene:

Componente	Colore del tappo	Formato		Quantità
Micropiastra	-	Pronto all'uso		48 pozzetti
Standard 1*	Bianco	Pronto all'uso	0 µg/l	1.3 ml
Standard 2*	Bianco	Pronto all'uso	15 µg/l	1.3 ml
Standard 3*	Bianco	Pronto all'uso	45 µg/l	1.3 ml
Standard 4*	Bianco	Pronto all'uso	135 µg/l	1.3 ml
Standard 5*	Bianco	Pronto all'uso	405 µg/l	1.3 ml
Conjugate	Rosso	Pronto all'uso		6 ml
Antibody	Nero	Pronto all'uso		3 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen	Marrone	Pronto all'uso		10 ml
Stop solution	Giallo	Pronto all'uso		14 ml

*) Il fattore di diluizione 5 per il campione è già stato considerato, pertanto le concentrazioni di citrinina dei campioni possono essere lette direttamente sulla curva standard.

5. Reagenti richiesti ma non forniti

5.1. Attrezzatura:

- spettrofotometro per micropiastre (450 nm)
- misurini graduati (in plastica o vetro) 100 ml
- vetreria per la preparazione dell'estratto del campione: imbuto filtrante e beuta da 50 ml
- macinino
- agitatore (opzionale)
- carta da filtro Whatman N° 1 o equivalente
- micropipette da 50 µl, 100 µl e 1000 µl

5.2. Reagenti:

- metanolo
- soluzione al 70 % di metanolo: miscelare 70 ml di metanolo al 100% con 30 ml di acqua distillata o deionizzata
- acqua distillata o deionizzata

6. Avvertenze e precauzioni per gli utilizzatori

Questo test deve essere effettuato solo da personale di laboratorio qualificato. Le istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente.

Gli standard contengono citrinina, prestare particolare attenzione. Evitare il contatto del reagente con la cute (indossare i guanti).

Decontaminare la vetreria e le soluzioni di citrinina immergendole in una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% v/v per una notte, regolando la soluzione a pH 7 con 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. Istruzioni per la conservazione

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

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

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

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

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

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 di colore rossastro, prima dell'esecuzione del test
- un valore inferiore a 0.6 unità di assorbanza ($A_{450\text{ nm}} < 0.6$) per lo standard zero

9. Preparazione dei campioni

Conservare i campioni in luogo fresco, al riparo dalla luce.

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

Prelevare un campione rappresentativo secondo le tecniche di campionamento normalmente accettate, tritarlo e miscelarlo con cura prima di procedere con la procedura di estrazione.

- aggiungere in un idoneo contenitore 5 g di campione tritato a 12.5 ml di metanolo al 70% *)
- agitare energicamente per 3 minuti (manualmente o con agitatore)
- filtrare l'estratto con carta da filtro Whatman N° 1
- diluire 1 ml del filtrato ottenuto con 1 ml di acqua distillata o deionizzata
- nel saggio utilizzare 50 µl di filtrato per ogni pozzetto

*) è possibile aumentare il volume di campione, adeguando proporzionalmente il volume della soluzione metanolo/acqua utilizzata.

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.
2. La reazione specifica comincia con l'aggiunta dell'anticorpo specifico. Tuttavia è bene applicare al test non più di tre strip se si utilizza una pipetta monocanale. Con pipette multicanale è invece possibile applicare fino a 6 strip.
3. Riporre tutti i reagenti a 2 - 8°C (35 – 46°F) subito dopo l'uso.

Gli **standard di citrinina** sono forniti pronti all'uso. In etichetta è già stato considerato un fattore di diluizione 5 per i campioni, pertanto le concentrazioni dei campioni possono essere lette direttamente sulla curva standard.

10.2. Procedura del test

È importante eseguire un'accurata procedura di lavaggio, evitare che i pozzetti si asciughino completamente tra le varie fasi del test ed evitare le pause protratte tra di esse. La riproducibilità negli saggi immunoenzimatici dipende in grande misura dall'efficacia dei lavaggi, pertanto si raccomanda di attenersi alle istruzioni di lavaggio fornite nel kit.

Evitare la luce diretta durante tutte le incubazioni; a tal fine si raccomanda di coprire la micropiastra.

1. Inserire un numero sufficiente di pozzetti nel supporto della micropiastra per tutti gli standard e i campioni. Registrare le posizioni assegnate a standard e campioni.
2. Pipettare nei pozzetti corrispondenti 50 µl di standard o di campione preparato; utilizzare un puntale nuovo per ogni standard o campione.
3. Aggiungere 50 µl di anticorpo anti-citrinina (tappo nero) in ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la micropiastra manualmente e incubare per 10 minuti (+/- 1) a temperatura ambiente (20 -25°C / 68 - 77°F).
4. Svuotare i pozzetti. Rovesciare la micropiastra su un foglio di carta assorbente e picchiettarla per eliminare tutto il liquido eventualmente rimasto. Ripetere per tre volte. Con un flacone per il lavaggio o una pipetta multicanale riempire ciascun pozzetto con 250 µl di acqua distillata o deionizzata. Svuotare nuovamente i pozzetti ed eliminare il liquido rimasto. Ripetere l'intera procedura di lavaggio altre due volte.
5. Aggiungere 100 µl della soluzione di coniugato all'enzima (anticorpo secondario, tappo rosso) sul fondo di ciascun pozzetto e incubare per 10 minuti (+/- 1) a temperatura ambiente (20 -25°C / 68 - 77°F).
6. Svuotare i pozzetti. Rovesciare la micropiastra su un foglio di carta assorbente e picchiettarla per eliminare tutto il liquido eventualmente rimasto. Ripetere per tre volte. Con un flacone per il lavaggio o una pipetta multicanale riempire ciascun pozzetto con 250 µl di acqua distillata o deionizzata. Svuotare nuovamente i pozzetti ed eliminare il liquido rimasto. Ripetere l'intera procedura di lavaggio altre due volte.
7. Aggiungere 100 µl della soluzione substrato/cromogeno (tappo marrone) in ciascun pozzetto e incubare per 5 minuti (+/- 0.5) a temperatura ambiente (20 -25°C / 68 - 77°F) e al buio.
8. Aggiungere 100 µl di soluzione di stop (tappo giallo) in ciascun pozzetto. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e

misurare le assorbanze a 450 nm. Leggere i risultati entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

11. Risultati

Per la valutazione dei saggi immunoenzimatici RIDASCREEN® è disponibile un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win.net (Art. No. Z9996).

Per determinazioni in singolo si raccomanda l'elaborazione logit-log, per una determinazione in doppio oppure multiplo utilizzare un'elaborazione di spline cubica.

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

Nota per il calcolo in assenza del software:

$$\frac{\text{assorbanza standard (o campione)}}{\text{assorbanza standard zero}} \times 100 = \% \text{ assorbanza}$$

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 citrinina espresse in µg/kg. Le concentrazioni di citrinina in µg/kg corrispondenti all'estinzione di ciascun campione possono essere lette 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.