

OCHRACARD

Cod. Prodotto: P48

Test di screening qualitativo per la rilevazione di Ocratossina A.
Solo per uso in vitro.

P48/V17/12.05.22

www.r-biopharm.com



R-BIOPHARM
RHÔNE LTD

Contenuto

	Pag
Principio del Test.....	4
Componenti del Kit.....	4
Reagenti non Forniti.....	4
Prodotti Accessori.....	4
Rischi	4
Metodi raccomandati e note applicative.....	5
Decontaminazione.....	5
Conservazione e Durata	5
Campionamento.....	5
Preparazione della Colonna	5
Eluizione	6
Preparazione del Tampone Fosfato (PBS) 0.01 M.....	7
Preparazione del Campione	8
• Cereali.....	9
• Frutta Secca.....	9
Procedura	10
Lettura dei Risultati del Test.....	10
Note.....	10
Qualità.....	11
Supporto Tecnico.....	11
Garanzia.....	11

Principio del Test

La procedura si basa sulla tecnologia dell'anticorpo monoclonale, che rende il test altamente specifico, sensibile, rapido e semplice da eseguire. La procedura di screening consente di rilevare la presenza di tossine a vari livelli di analisi secondo la normativa Europea ed Internazionale.

La tossina è estratta dal campione, filtrata e fatta passare attraverso la colonna di purificazione prima di essere diluita ed applicata alla card. Il coniugato è applicato alla membrana e quello che non si è legato viene rimosso mediante lavaggio. Successivamente viene aggiunto substrato incolore e la card viene incubata per 5 minuti. Alla fine si aggiunge la soluzione di stop alla membrana. Una macchia di colore porpora deve apparire nel sito di controllo per indicare che il test è valido. Una macchia di colore porpora nel sito del campione indica che la contaminazione è inferiore rispetto al valore di cut-off della card. Se non si sviluppa alcuna colorazione nel sito del campione significa che la contaminazione è più elevata rispetto al livello di cut-off della card.

L'analisi richiede circa 30 minuti.

Componenti del Kit

- 10 card (20 determinazioni)
- 20 colonne ad immunoaffinità
- 10 pastiglie PBS (tampone fosfato salino)
- 20 provette di raccolta per i campioni
- 20 provette di diluizione del filtrato
- 2 x 22 ml di tampone di diluizione del campione
- 2.5 ml di coniugato pronto all'uso (etichetta rossa)
- 4 ml di tampone di lavaggio (etichetta verde)
- 4 ml di substrato (etichetta blu)
- 4 ml di soluzione di stop (etichetta gialla)

Reagenti non Forniti

- Acqua distillata o deionizzata (adatta per HPLC, ad esempio MilliQ)
- Metanolo

Prodotti Accessori

- Whatman No. 113 o No. 4
- Supporto per colonne ad immunoaffinità (CR1)*
- Pacchetto di accessori per colonne ad immunoaffinità (AP01)*

* Disponibili presso R-Biopharm. Per ulteriori informazioni potete contattare il distributore locale R-Biopharm.

Rischi

Le micotossine sono sostanze molto pericolose. Solo laboratori attrezzati possono eseguire questo tipo di analisi, durante le quali è necessario indossare indumenti protettivi come camici, guanti e occhiali protettivi.

Conservare i solventi infiammabili in un armadietto antiesplorazione. Se possibile, operare sotto cappa chimica ed utilizzare attrezzature protettive.

Per ulteriori informazioni, è possibile contattare il distributore locale R-Biopharm e richiedere la scheda di sicurezza.

Metodi raccomandati e note applicative

I metodi sono disponibili per tutte le matrici a norma di legge, oltre che per altri prodotti. Per ulteriori informazioni contattare il distributore R-Biopharm.

Decontaminazione

Le soluzioni standard in eccesso devono essere trattate, prima dello smaltimento, con almeno un decimo del loro volume di ipoclorito di sodio al 5 %. Immergere la strumentazione e il materiale residuo contaminato in una soluzione di ipoclorito di sodio al 5 % per 30 minuti, poi aggiungere il 5 % di acetone e lasciare in ammollo per altri 30 minuti. Sciacquare abbondantemente con acqua prima dello smaltimento. Dopo la decontaminazione lavare scrupolosamente tutta l'attrezzatura di laboratorio utilizzata. Incenerire ove consentito dai regolamenti.

Conservazione e Durata

Le card hanno una validità di 12 mesi dalla data di produzione se conservate a 2 - 8 °C. Non congelare.

Assicurarsi che le colonne non si siano asciugate e che contengano il tampone sopra al gel. Si tenga presente che gli anticorpi contenuti nelle colonne possono essere denaturati da forti variazioni di temperatura o pH.

Campionamento

E' necessario ottenere un campione sufficientemente rappresentativo seguendo una delle procedure di campionamento ufficialmente riconosciute. Si raccomanda di tritare finemente almeno 1 kg di campione rappresentativo e di prelevare ed estrarre una parte di esso (10 - 50 g in base al metodo utilizzato).

Preparazione della Colonna

Le colonne ad immunoaffinità devono trovarsi a temperatura ambiente prima dell'uso.

E' normale che ci sia dello spazio tra il gel ed il setto poroso. Talvolta, durante il trasporto, si può formare una bolla in questo spazio. In questi casi, per rimuovere la bolla, basta semplicemente picchiare la base della colonna su una superficie rigida.

Rimuovere il cappuccio dalla parte superiore della colonna ed eliminarlo. Fissare saldamente la colonna ad un serbatoio in vetro da siringa mediante adattatore, quindi inserirla nel supporto per colonne o nel supporto a morsetto.

Eluizione

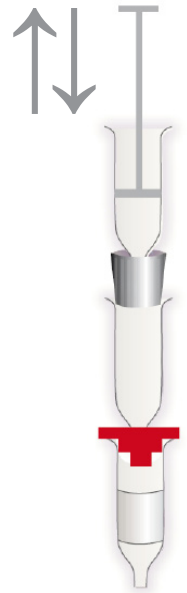
Al fine di eluire completamente la tossina o le tossine dalla colonna di immunoaffinità è fondamentale che il solvente rimanga a contatto con l'anticorpo contenuto nella sospensione in gel per un periodo di tempo sufficiente. Questo assicura che tutti i legami tra l'anticorpo e la tossina siano spezzati, e infine il rilascio di tutta la tossina dalla colonna per l'analisi con il sistema di rivelazione prescelto

Per garantire che il solvente rimanga a contatto con gli anticorpi in sospensione nel gel per un periodo di tempo sufficiente, è possibile utilizzare uno qualsiasi dei seguenti metodi di eluizione: -

Backflush (metodo preferito da R-Biopharm): backflush sollevando e abbassando delicatamente lo stantuffo della siringa durante il passaggio del solvente attraverso la colonna. Questo processo inverte la direzione del flusso dell'eluato attraverso il gel. La procedura dovrebbe essere ripetuta 3 volte prima di raccogliere l'eluato. Procedere alla fase successiva del metodo.

Applicazione di piccoli volumi di solvente: applicare il volume di solvente necessario per l'eluizione in due o tre aliquote più piccole. Attendere che ogni aliquota rimanga a contatto con la sospensione in gel per almeno 30 secondi prima di lasciarla completamente passare attraverso la sospensione per la raccolta. Procedere alla fase successiva del metodo.

Incubazione con solvente: applicare l'intero volume di solvente necessario per l'eluizione e lasciar passare 2-3 gocce di solvente attraverso la colonna per la raccolta. Attendere che la parte restante del solvente resti a contatto con la sospensione in gel per almeno 60 secondi prima di lasciarla completamente passare attraverso la sospensione per la raccolta. Procedere alla fase successiva del metodo.



Preparazione del tampone fosfato (PBS) 0.01 M

1. Sciogliere 1 pastiglia di PBS in 100 ml di acqua.

Preparazione del Campione

• Cereali

Questa procedura è stata testata su un certo numero di matrici tra cui grano, orzo, mais.

1. Pesare 50 g di campione tritato in un contenitore per miscelatore resistente ai solventi dalla capacità di 1 litro.
2. Aggiungere 100 ml di metanolo all' 80 % e mescolare ad alta velocità per 2 minuti.
3. Filtrare il campione utilizzando carta da filtro Whatman N. 113 oppure N. 4. In alternativa centrifugare a 4,000 rpm per 10 minuti.
4. Diluire 9 ml del filtrato con 18 ml di tampone fosfato (PBS).
5. In base al livello di screening richiesto far passare l'appropriato volume del filtrato diluito attraverso la colonna di immunoaffinità seguendo la tabella sotto indicata.

Livello di Screening	Volume del Filtrato Diluito da Applicare alla Colonna
3 ppb	25 ml
4 ppb	20 ml
5 ppb	15 ml
10 ppb	7.5 ml

6. Far passare il volume richiesto del filtrato diluito attraverso la colonna ad immunoaffinità con un flusso di 2 ml al minuto (in alternativa è possibile lasciar passare il campione attraverso la colonna per gravità). Per la "cattura" della tossina da parte dell'anticorpo è essenziale applicare una pressione lenta e costante.
7. Lavare la colonna facendo passare 10 ml di PBS con un flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
8. Eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1 ml di metanolo al 100 % e raccoglierlo in una idonea provetta. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
9. Far passare 2 ml del tampone di diluizione del campione attraverso la colonna e raccoglierlo nella stessa provetta dell'eluato per avere un volume finale di 3 ml.
10. La soluzione purificata è ora pronta per l'analisi. Si prega di far riferimento al paragrafo relativo alla Procedura di Analisi.

Preparazione del Campione

• Frutta Secca

Questo metodo è stato testato su diversi frutti disidratati fra cui uva sultanina, uva passa, fichi, datteri e albicocche.

1. Pesare 50 g di campione tritato in un contenitore per miscelatore resistente ai solventi dalla capacità di 1 litro.
2. Aggiungere 100 ml di metanolo al 100 % e mescolare ad alta velocità per 1 minuto.
3. Aggiungere 100 ml di bicarbonato di soio all'1 % e mescolare ad alta velocità per 2 minuti.
4. Filtrare il campione utilizzando carta da filtro Whatman N. 113 oppure N. 4. In alternativa centrifugare a 4,000 rpm per 10 minuti.
5. Diluire 12 ml del filtrato con 12 ml di PBS.
6. In base al livello di screening richiesto far passare l'appropriato volume del filtrato diluito attraverso la colonna di immunoaffinità seguendo la tabella sotto indicata.

Livello di Screening	Volume del Filtrato Diluito da Applicare alla Colonna
2 ppb	25 ml
5 ppb	20 ml
10 ppb	10 ml

7. Far passare il volume richiesto del filtrato diluito attraverso la colonna ad immunoaffinità con un flusso di 2 ml al minuto (in alternativa è possibile lasciar passare il campione attraverso la colonna per gravità). Per la "cattura" della tossina da parte dell'anticorpo è essenziale applicare una pressione lenta e costante.
8. Lavare la colonna facendo passare 10 ml di PBS con un flusso di circa 5 ml al minuto. Far passare aria attraverso la colonna per rimuovere ogni residuo di liquido rimasto.
9. Eluire la tossina dalla colonna con un flusso di 1 goccia al secondo utilizzando 1 ml di metanolo al 100 % e raccogliero in una idonea provetta. Per ulteriori informazioni consultare la sezione Eluizione.
10. Far passare 2 ml del tampone di diluizione del campione attraverso la colonna e raccogliero nella stessa provetta dell'eluato per avere un volume finale di 3 ml.
11. La soluzione purificata è ora pronta per l'analisi. Si prega di far riferimento al paragrafo relativo alla Procedura di Analisi.

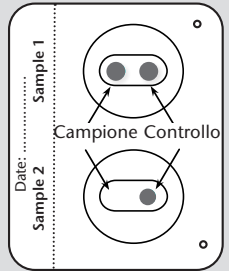
Nota: a seconda del livello di screening richiesto, deve essere applicato alla card il volume appropriato di campione limpido secondo la tabella seguente. Successivamente seguire il metodo descritto nella pagina seguente.

Livello di Screening	Volume del Filtrato Diluito da Applicare alla OCHRACARD
2 ppb	1 ml (2 x 500 µl)
5 ppb	500 µl
10 ppb	500 µl

Procedura

1. Prelevare il kit dal frigorifero e lasciarlo a temperatura ambiente per almeno 30 minuti prima di eseguire il test.
2. Applicare 500 µl del campione purificato sulla membrana e lasciarlo filtrare attraverso di essa. Questa operazione non dovrebbe richiedere più di 5 minuti.
3. Una volta che il filtrato è passato attraverso la membrana, applicare 100 µl del coniugato pronto all'uso (etichetta rossa) e attendere che filtri completamente attraverso di essa.
4. Una volta che il coniugato è passato attraverso la membrana, applicare 100 µl del tampone di lavaggio (etichetta verde). Attendere che filtri attraverso la membrana e ripulire l'area attorno alla porta con della carta assorbente.
5. Applicare 100 µl di substrato (etichetta blu) alla membrana e attendere i 5 minuti necessari perché la membrana si colori (avviare il timer all'aggiunta del substrato).
6. Dopo 5 minuti applicare 100 µl di soluzione di stop (etichetta gialla) e leggere immediatamente i risultati non appena la soluzione di stop è filtrata completamente attraverso la membrana.

Letture dei Risultati

	<p>Risultato Negativo</p> <p>Risultato Positivo</p>	<p>Il campione è da considerarsi negativo (inferiore rispetto al livello di cut-off) quando il colore sviluppatosi nel pallino del campione e in quello di controllo è chiaramente visibile in entrambi.</p> <p>Il campione è da considerarsi positivo (superiore rispetto al livello di cut-off) quando nessun colore è rilevabile nel pallino relativo al campione.</p>
--	---	---

Perché il risultato del test sia valido il pallino di controllo deve assumere una colorazione porpora ben visibile, ma non è necessario che il colore del pallino relativo al campione e quello del pallino di controllo abbiano la stessa intensità. Se vi sono dubbi per quanto riguarda la presenza di un pallino, si consiglia di tenere la card a debita distanza (contro uno sfondo scuro). Se il pallino è chiaramente visibile a distanza, allora può essere considerato come effettivamente presente.

Note

- I due pallini azzurri su ciascuna porta di ogni card non ancora utilizzata scompaiono durante l'esecuzione del saggio. Assicurarsi che siano visibili prima di iniziare l'analisi.
(Nota: possono avere una colorazione molto debole in apparenza)
- Ricorda: è possibile analizzare due campioni su una card, un campione per ciascuna porta. Ogni porta deve avere il suo controllo interno.
- La seconda porta deve essere utilizzata entro una settimana dalla prima porta. Prestare attenzione affinché il sigillo della seconda porta rimanga posizionato correttamente fino a quando non deve essere utilizzato. Si consiglia di staccare delicatamente il sigillo dalla parte della prima porta e tagliarlo, mantenendo la restante parte saldamente in posizione sopra la seconda porta.
- Non utilizzare reagenti appartenenti ad un determinato lotto con reagenti di un lotto differente. Non sostituire i reagenti con quelli di un altro fornitore.
- Assicurarsi sempre che non vi siano bolle d'aria nelle gocce del substrato.
- L'utilizzo di tempi di incubazione differenti rispetto a quelli specificati può causare inaccuratezza dei risultati.
- Prima dell'aggiunta del reagente successivo, lasciare che il liquido si sia completamente assorbito.

Qualità

I prodotti RBR sono sviluppati, prodotti, verificati e spediti in accordo con le normative dei sistemi registrati di gestione della qualità ISO 9001 e ISO 13485 che ne assicurano l'alta e costante qualità e la rispondenza ai requisiti di performance da noi stabiliti. I nostri prodotti sono stati impiegati in molti studi collaborativi per l'elaborazione di metodi standard europei e internazionali e sono largamente utilizzati dai principali enti, industrie alimentari e laboratori governativi. Referenze sui prodotti RBR per i clienti sono disponibili su richiesta.

Supporto tecnico

Sensibile alle richieste di assistenza e suggerimenti che possono emergere da parte della clientela, RBR offre i seguenti servizi:

- Analisi dei campioni problematici
- Procedure per campioni difficili
- Referenze dalla letteratura della biblioteca RBR
- Installazione e supporto della KOBRA® CELL
- Consulenza per i parametri di rilevazione
- Consulenza per la preparazione e la manipolazione degli standard
- Aggiornamenti sulle normative e sulla preparazione dei campioni e altre notizie via e-mail
- Fornitura di campioni arricchiti

Contattare il rivenditore R-Biopharm di zona per ulteriori informazioni.

Garanzia

R-Biopharm Rhône Ltd 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 risultasse difettosi, R-Biopharm Rhône Ltd si impegna a fornire prodotti sostitutivi. L'utilizzatore si assume qualsiasi rischio e responsabilità derivante dall'impiego dei prodotti e delle procedure R-Biopharm Rhône Ltd. R-Biopharm Rhône Ltd non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo dei prodotti o delle procedure R-Biopharm Rhône Ltd.

Prodotto da:
R-Biopharm Rhône Ltd
Scozia

Distribuito da:
R-Biopharm Italia Srl
Via Morandi, 10
20077 Melegnano MI
Tel: 02 9823 3330
Fax: 02 9834 100
info@r-biopharm.it