

RIDASCREEN[®] Histamin

Test immunoenzimatico per il dosaggio quantitativo di
Istamina

Art. No.: R1601 (96 pozzetti)

Art. No.: R1604 (48 pozzetti)

Test in vitro

Conservare a 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germania

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® Histamin

Introduzione

RIDASCREEN® Histamin (Art. No.: R1601, 96 pozzetti / Art. No.: R1604, 48 pozzetti) è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di istamina in campioni di alimenti.

Tutti i reagenti richiesti per il saggio immunoenzimatico – compresi gli standard – sono contenuti nel kit.


Il kit è sufficiente per 96 o 48 analisi (comprese le analisi degli standard).

Per la quantificazione è richiesto uno spettrofotometro per micropiastre.

Preparazione campioni: diverse in base al campione (vedi par. 8.)

Tempo richiesto:	preparazione dei campioni (10 campioni).....	ca 15 min.
	esecuzione del test (tempo di incubazione)	90 min.
	esecuzione del test (tempo di incubazione con agitatore)	70 min.
Limite rilevabilità:	spumante, vino rosso, vino bianco	250 ppb
	latte.....	100 ppb
	formaggio, pesce fresco e conservato.....	2.5 ppm
	sfarinati di pesce	100 ppm
Recupero:	spumante, vino rosso, vino bianco	95 %
	latte.....	109 %
	formaggio, pesce fresco e conservato.....	100 %
	sfarinati di pesce	96 %
Specificità:	Istamina	100 %
	3-Metil istamina	ca. 0.01 %
	Tiramina	n.d.
	L-Fenilalanina.....	n.d.
	L-istidina	n.d.
	L-tirosina	n.d.
	Triptamina	n.d.
	Acido 5-idrossi-indolo-acetico.....	n.d.
	Serotonina	n.d.

Simboli utilizzati:

	Contenuto sufficiente per "n" test		Produttore
	Temperatura di conservazione	LOT	Codice lotto
	Utilizzare entro il	CONT	Contenuto
	Leggere l'intero protocollo prima dell'utilizzo	REF	Art. No.
IVU	Solo per utilizzo in vitro	REC	Ricostituire con
LYO	Liofilizzato		

1. Scopo

RIDASCREEN® Histamin è un immunodosaggio enzimatico competitivo per l'analisi quantitativa di istamina in campioni di vino rosso, vino bianco, spumante, latte, formaggio, pesce fresco, pesce conservato e sfarinati di pesce.

2. Generale

L'istamina è un prodotto della decomposizione dell'istidina causata dalla crescita di determinati batteri in alimenti ricchi di proteine quali il pesce, il formaggio e la carne, e nello spumante, nel vino e nella birra. La quantità di istamina che si forma dipende dalla specie batterica, dalla temperatura e dal tempo di esposizione, e può superare i 1000 ppm (mg/kg). Alti livelli di istamina riscontrati nei pesci sono stati associati con un tipo di avvelenamento chiamato "avvelenamento da sgombroide". E' necessario effettuare misurazioni nell'ambito dei controlli di qualità in modo da minimizzare la presenza di pesce contaminato da istamina. I prodotti ittici di buona qualità contengono meno di 10 ppm di istamina. Il valore limite ammesso per il pesce e i suoi derivati è di 100 mg/kg, ma in alcuni paesi scende a 50 mg/kg. In Svizzera il limite massimo di istamina contenuta nel vino è stabilito in 10 mg/l.

3. Principio del test

Dopo la preparazione del campione, l'istamina viene derivatizzata quantitativamente in N-acilistamina da un agente di acilazione. Nelle analisi immunoenzimatiche competitive, l'istamina acilata libera e quella legata competono per i siti di legame anticorpali.

Dopo il lavaggio, vengono aggiunti anticorpi secondari coniugati con perossidasi (enzima coniugato), che si legano ai complessi istaminici. L'enzima coniugato non legato viene rimosso con il lavaggio. Successivamente vengono aggiunti ai

pozzetti ed incubati il substrato enzimatico e il cromogeno. L'enzima coniugato legato converte il cromogeno incolore in un prodotto blu. L'aggiunta dello stop porta al viraggio del colore dal blu al giallo. La misurazione fotometrica viene eseguita a 450 nm. L'assorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione di istamina nel campione.

4. Reagenti forniti

Ogni kit contiene materiale sufficiente per 96 (R1601) o 48 (R1604) analisi (incluse le analisi degli standard). Ogni kit contiene:

Reagenti per l'acilazione del campione:

1 x Acylation plate	Piastra di acilazione (non coattata) con 96 pozzetti per l'acilazione
96 (R1601) o 48 (R1604) x Acylation tubes	Provette per acilazione (in plastica) per l'acilazione
6 x Standard 1-6	Standard di istamina , (4 ml ciascuno) 0 ppb, 0.5 ppb, 1.5 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 50 ppb
1 x Control 1	Controllo 1 (4 ml), concentrazione vedi fiala
1 x Control 2	Controllo 2 (4 ml), concentrazione vedi fiala
2 x (R1601) o 1 x (R1604)	Reagente di acilazione (1.5 ml), pronto all'uso
Acylation reagent	
1 x Acylation buffer	Tampone di acilazione (22 ml), pronto all'uso

Reagenti per l'analisi immunoenzimatica:

1 x Microtiter plate	Micropiastra con 96 o 48 pozzetti (12 strip, R1601 o 6 strip, R1604 - da 8 pozzetti ciascuna) coattati con istamina
1 x Conjugate	Coniugato (12 ml, R1601 o 6 ml, R1604) anticorpo coniugato con perossidasi, pronto all'uso
1 x Anti-histamine antibody	Anticorpi anti-istamina (12 ml, R1601 o 6 ml, R1604) pronti all'uso
1 x Substrate-/Chromogen	Substrato/cromogeno (12 ml, R1601 o 6 ml, R1604) contiene tetrametilbenzidina, pronto all'uso
1 x Stop solution	Soluzione di stop (12 ml), contiene acido solforico 0.5 N, pronta all'uso
1 x Washing buffer	Tampone di lavaggio (20 ml), concentrato 50x

5. Materiale richiesto ma non fornito

5.1. Attrezzatura:

- lettore colorimetrico per micropiastre (450 nm)
- macinino/tritatore, mortaio o omogeneizzatore da laboratorio
- centrifuga e fiale in vetro per centrifuga
- agitatore, ad esempio vortex
- micropipette a volume variabile da 20 µl - 200 µl e 200 - 1000 µl
- per ridurre il tempo di incubazione: agitatore per micropiastra (MTP) (ampiezza di agitazione 3 mm, ca. 600 rpm)

5.2. Reagenti:


- acqua distillata o deionizzata
- per i campioni di latte: tampone PBS 10 mM, Tween 20 0.05% (es. Sigma P3563)

6. Conservazione

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

I pozzetti non utilizzati vanno riposti insieme all'essiccante nella loro confezione originale, che deve essere ben richiusa e conservata a 2-8°C (35-46°F).

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

La garanzia di qualità decade dopo la data di scadenza (vedi simbolo  sulla confezione).

Non scambiare singoli reagenti appartenenti a kit con numeri di lotto differenti.

7. Indicazioni di instabilità o di deterioramento dei reagenti

- Una colorazione blu della soluzione substrato/cromogeno prima della pipettatura
- Un'assorbanza inferiore a 0,9 ($A_{450nm} < 0.9$) per lo standard 1

8. Preparazione dei campioni

Le provette per l'acilazione o i pozzetti della piastra di acilazione sono monouso per evitare contaminazioni.

8.1. Spumante, vino bianco e vino rosso

- diluire 20 µl di vino in 10 ml di acqua distillata
- utilizzare nel saggio 100 µl per ogni provetta di acilazione o pozzetto della piastra di acilazione

8.2. Latte

- centrifugare 4 ml di latte per 10 minuti a 3000 g e a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F), quindi asportare lo strato di grasso
- miscelare 20 µl di latte con 4 ml di tampone PBS (vedi par. 5.2.)
- utilizzare nel saggio 100 µl ogni per pozzetto della piastra di acilazione

8.3. Formaggio, pesce (fresco e conservato)

- omogeneizzare 10 g di campione
- miscelare accuratamente 1 g di omogenato con 9 ml di acqua distillata
- centrifugare la sospensione per 5 minuti a 2500 g e a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- asportare lo strato di grasso
- miscelare bene 1 ml del surnatante con 9 ml di acqua
- diluire 200 µl di questa soluzione in 9.8 ml di acqua distillata
- utilizzare nel saggio 100 µl per ogni provetta di acilazione o per ogni pozzetto della piastra di acilazione

8.4. Farina di pesce

- miscelare 1 g di campione di farina di pesce con 200 ml di acqua distillata e agitare per 15 min.
- centrifugare una parte per 5 minuti a 2500 g e a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F)
- diluire 200 µl del surnatante in 200 ml di acqua distillata
- utilizzare nel saggio 100 µl per ogni provetta di acilazione o per ogni pozzetto della piastra di acilazione

9. Esecuzione del test

9.1. Indicazioni preliminari

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

Il **tampone di lavaggio** è fornito concentrato 50X. Diluire 1:50 (1+49) il tampone così concentrato (a 20-25°C / 68-77°F) con acqua distillata prima dell'uso (es. 10

ml di concentrato + 490 ml di acqua distillata). Il tampone diluito è stabile a 2-8°C (35-46°F) per circa quattro settimane.

Il **reagente di acilazione** è fornito pronto all'uso e ha una temperatura di congelamento di 18.5°C (65°F). Per essere utilizzato il reagente di acilazione deve essere trovarsi a temperatura ambiente e presentarsi come soluzione omogenea e priva di cristalli. Il reagente di acilazione può essere conservato a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) o portato a temperatura ambiente prima dell'uso.

9.2. Procedura per l'acilazione

Pipettare con cautela onde evitare fuoriuscite di liquido.

1. Tutti gli standard, i controlli e i campioni sono da eseguire in duplicato. (**Art. No. R1604, 48 pozzetti**: utilizzare solo 48 cavità della piastra di acilazione -non tutte e 96- perché la piastra per il saggio immunoenzimatico ne contiene solo 48). Registrare le posizioni degli standard e dei campioni.

In alternativa, inserire il numero richiesto di provette di acilazione nella piastra di acilazione e utilizzarle per la reazione.

2. Aggiungere 100 µl di ciascuno standard, controllo o campione preparato nelle provette di acilazione o nei pozzetti corrispondenti della piastra di acilazione.
3. Aggiungere 25 µl di reagente di acilazione a ciascuna provetta di acilazione o a ciascun pozzetto.
4. In ogni provetta di acilazione o pozzetto aggiungere 200 µl di tampone di acilazione, agitare leggermente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F).
5. Utilizzare 25 µl di questa soluzione per il saggio immunoenzimatico.

9.3. Procedura per il test ELISA

Pipettare con cautela onde evitare fuoriuscite di liquido. Eseguire scrupolosamente la procedura di lavaggio raccomandata. Evitare l'asciugamento dei pozzetti durante le varie fasi della procedura.

1. Inserire nel supporto della micropiastra un numero sufficiente di pozzetti per tutti gli standard, i controlli e i campioni da eseguire in duplicato e registrare le rispettive posizioni degli standard e dei campioni.
2. Aggiungere ai rispettivi pozzetti 25 µl della soluzione standard, del controllo o dei campioni preparati e precedentemente acilati.
3. In ogni pozzetto aggiungere 100 µl di anticorpi anti-istamina, miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per

40 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F). In alternativa utilizzare l'agitatore MTP a circa 600 rpm.

4. Eliminare il liquido contenuto nei pozzetti picchiando energicamente su carta assorbente il supporto della micropiastra capovolto per tre volte di seguito, fino a completo svuotamento. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 9.1.) e svuotarli nuovamente, ripetendo l'operazione altre due volte.
5. Aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl di coniugato. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 20 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F), oppure per 10 minuti con agitatore MTP (a ca. 600 rpm).
6. Eliminare il liquido contenuto nei pozzetti picchiando energicamente su carta assorbente il supporto della micropiastra capovolto per tre volte di seguito, fino a completo svuotamento. Riempire tutti i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio (vedi par. 9.1.) e svuotarli nuovamente, ripetendo l'operazione altre due volte.
7. Aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl della soluzione substrato/cromogeno. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (20-25°C / 68-77°F) e **al buio**. In alternativa agitare per 15 minuti con agitatore MTP a ca. 600 rpm.
8. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di stop. Miscelare delicatamente facendo oscillare la piastra manualmente e misurare l'assorbanza a 450 nm dopo azzeramento contro aria. Leggere i risultati entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

10. Risultati

Per la valutazione dei test RIDASCREEN® ELISA è disponibile un apposito software, denominato RIDA®SOFT Win (Art. No. Z9999).

L'andamento della curva standard è mostrato nel Certificato di Assicurazione di Qualità incluso nel kit.

La concentrazione di istamina in µg/kg (ppb) corrispondente al valore di assorbanza di ciascun campione è riportata sulla curva di calibrazione e viene poi moltiplicata per il corrispondente fattore di diluizione. Il fattore di diluizione dipende dal tipo di preparazione del campione eseguita ed è indicato nella tabella seguente.

Preparazione del campione	Campione	Fattore di diluizione
8.1.	vino rosso, vino bianco e spumante	500
8.2.	latte	200
8.3.	formaggio, pesce fresco e conservato	5 000
8.4.	farina di pesce	200 000

Raccomandazione:

Risultati analitici ottimali si ottengono osservando quanto segue:

- diluire ulteriormente i campioni con valori di assorbanza inferiori a 0.4 e analizzarli nuovamente
- analizzare ogni campione in duplicato
- misurare i controlli con una deviazione massima di $\pm 30\%$ (altrimenti ripetere il saggio)
- temperatura ottimale per il saggio: 20-25°C / 68-77°F).

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 s'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.