

COD 14202 10 tests
Reactivos para la determinación de ocratoxina-A en muestras de alimentos
Only for <i>in vitro</i> use in the laboratory

OCRATOXINA-A rapid test

ENZIMOINMUNOENSAYO EN NITROCELULOSA

INFORMACIÓN GENERAL

La ocratoxina-A es una micotoxina nefrotóxica y hepatocarcinogénica producida por *Penicillium verrucosum* y *P. viridicatum* en climas templados y fríos, y también por varias especies de *Aspergillus* tales como *A. ochraceus* en zonas cálidas y tropicales del mundo¹. Se ha encontrado ocratoxina-A en diversos cereales y otros productos vegetales, en el café, vino, y pienso para animales. Debido a la contaminación en piensos o alimentos, la ocratoxina-A también puede detectarse en la sangre humana así como en tejidos y fluidos biológicos de los cerdos, como los riñones, el hígado, los músculos, la sangre, la orina y las heces².

Los niveles máximos (ML) establecidos legalmente en Europa para la ocratoxina-A dependen de si los alimentos se utilizan directamente para el consumo humano o como materia prima para productos elaborados. Los ML para la ocratoxina-A varían de 2 a 10 µg/kg (ppb)^{3,4}.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El Ocratoxina-A Rapid Test es un enzimoimmunoensayo competitivo sobre nitrocelulosa para el cribaje de la ocratoxina-A en muestras de alimentos (maíz, arroz, trigo, sorgo, cebada, avena, centeno, café, arroz, frijoles secos, vino y especias).

Se han inmovilizado anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón en la línea de test (T) de la membrana de nitrocelulosa. Se añaden secuencialmente anti-ocratoxina-A de ratón, muestra y ocratoxina-A marcada con enzima. El anticuerpo de ratón se une al anticuerpo de conejo inmovilizado. La ocratoxina-A de la muestra compete con el conjugado para unirse al anticuerpo específico de ratón. El conjugado no unido se elimina mediante un paso de lavado. Se añade entonces el sustrato cromógeno (tetrametilbencidina). La enzima unida transforma el sustrato cromógeno en un producto azul que aparece en forma de una banda coloreada.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Devices. 2 x 5 casetes.

Reagent A (Extraction solution). 3 frascos. Solución de extracción.

Reagent B (Dilution buffer). 1 vial. Tampón de dilución.

Reagent C (Antibody solution). 1 vial. Solución de anticuerpo, tapón amarillo.

Reagent D (Enzyme conjugate). 1 vial. Conjugado enzimático, tapón verde.

Reagent E (Washing buffer). 1 vial. Tampón de lavado, tapón blanco.

Reagent F (Tetramethylbenzidine substrate). 1 vial. Sustrato, tapón azul.

Filters and Syringes. 10 unidades de cada uno. Filtros y jeringas

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8 °C. Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Los componentes líquidos son estables una vez abiertos hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta siempre que se conserven a la temperatura recomendada, bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Color azul del sustrato (Reagent F).
- Devices (casetes): roturas en el sobre contenedor, presencia de líneas o manchas en la membrana antes de utilizar.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los Reactivos están listos para su uso.

PRECAUCIONES

- La ocratoxina-A es un compuesto tóxico y carcinógeno. Evitar el contacto con la boca y piel. Tomar precauciones para evitar su inhalación. Cualquier material contaminado con ocratoxina-A debe ser destruido o descontaminado con una solución de hipoclorito de sodio (10 % v/v).
- Evitar el contacto de los materiales biológicos con la piel y mucosas.
- No comer, beber, fumar, almacenar o preparar comida, o aplicar cosméticos en el área de trabajo designada.
- El TMB es tóxico por inhalación, en contacto con la piel o si es ingerido. Manejarlo con el debido cuidado.
- No utilizar componentes caducados ni mezclar componentes de distintos lotes.

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Debe obtenerse una muestra homogénea y representativa del compuesto.

1. Triturar y pulverizar la muestra (50-100 g) hasta obtener un polvo fino y homogéneo.
2. Extracción de la muestra: Para detectar 4 ppb: extraer 5 g de muestra pulverizada con 15 mL de Reactivo A.
3. Agitar manualmente y a temperatura ambiente durante 3 minutos y dejar sedimentar la muestra hasta obtener un sobrenadante limpio.
4. **Para cereales y café verde:** Aspirar 1,4 mL del tampón de dilución (Reagent B) con una jeringa y aspirar a continuación 1 mL de sobrenadante hasta alcanzar la marca de 2,4 mL. Mezclar suavemente. Fijar el filtro en la jeringa.

Para otras muestras: Aspirar aproximadamente 1,5 mL del sobrenadante con una jeringa. Fijar el filtro en la jeringa.

PROCEDIMIENTO

Atemperar los componentes del kit a temperatura ambiente.

1. Abrir la bolsa y tomar la cantidad necesaria de casetes. Colocar los casetes a utilizar en una superficie plana. Guardar los casetes que no se utilicen en la bolsa bien cerrada y con el saquito desecante en su interior.
2. Depositar 2 gotas de Reactivo E en el centro del pocillo. Dejar que el líquido fluya completamente.
3. Depositar 2 gotas de Reactivo C en el centro del pocillo. Dejar que el líquido fluya completamente.
4. Añadir 20 gotas del extracto de la muestra utilizando la jeringa. Dejar que el líquido fluya completamente.
5. Añadir 2 gotas de Reactivo D. Dejar que el líquido fluya completamente.
6. Lavar la membrana con 1 gota de Reactivo E. Dejar que el líquido fluya.
7. Lavar la membrana con 3 gotas de Reactivo E. Dejar que el líquido fluya completamente.
8. Añadir 5 gotas de Reactivo F y observar el desarrollo de color. La interpretación óptima del resultado se obtiene entre 5 y 6 minutos tras la aplicación.

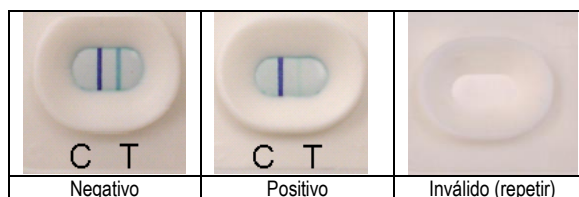
LECTURA

Examinar la presencia de bandas de color dentro del pocillo del casete.

Resultado negativo. Aparecen 2 bandas de color: una en la zona "T" y otra en la zona "C" del pocillo.

Resultado positivo. La banda de color aparece solo en la zona "C" del pocillo.

Resultado inválido. Ausencia de bandas. Repetir el ensayo con un nuevo casete.



CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

- Valor discriminante (cut-off): 4 ppb.
- Especificidad: El anticuerpo utilizado reacciona con la ocratoxina-A (100 %) y con la ocratoxina-B (9 %).

BIBLIOGRAFÍA

1. Kuiper-Goodman. Risk assessment of the mycotoxin Ochratoxin-A Biomedical and Environmental Sciences: 2, 179-248, 1989.
2. Marley E.C., Nicol W.C. and Candlish A.A.G. Determination of Ochratoxin-A by immunoaffinity column clean-up and HPLC in wheat and pig liver. Mycotoxin Research: 11, 111-116, 1995.
3. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. European Commun. L77 (2001) 1-13.
4. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.